Rôle d'une ATPase de type P4 dans l'homéostasie des glycérolipides membranaires chez Arabidopsis thaliana

César Botella

▶ **To cite this version:**

César Botella. Rôle d'une ATPase de type P4 dans l'homéostasie des glycérolipides membranaires chez Arabidopsis thaliana. Biologie végétale. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV019 . tel-01810503

HAL Id: tel-01810503
https://theses.hal.science/tel-01810503

Submitted on 8 Jun 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.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie Végétale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

César BOTELLA

Thèse dirigée par **Maryse BLOCK** et
codirigée par **Juliette JOUHET**

préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Rôle d'une ATPase de type P4 dans l'homéostasie des glycérolipides membranaires chez *Arabidopsis thaliana*

Thèse soutenue publiquement le **« 7 décembre 2016 »**,
devant le jury composé de :

Pr Christelle BRETON
Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes, Présidente
Pr Jean Denis FAURE
Professeur des Universités, INRA-AgroParisTech, Rapporteur
Dr Sébastien MONGRAND
Directeur de Recherche, Université Bordeaux Segalen, Rapporteur
Dr Guillaume LENOIR
Maître de Conférences, Université Paris Sud, Membre
Dr Juliette JOUHET
Chargée de Recherche, Université Grenoble Alpes, Membre
Dr Maryse BLOCK
Directeur de Recherche, Université Grenoble Alpes, Membre

Je remercie Norbert Rolland pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale.

J'exprime toute ma reconnaissance et mon admiration envers Eric Maréchal qui m'a accueilli au sein de l'équipe Lipidomique Membranaire, qui m'a transmis la passion de l'étude des lipides et qui restera une source d'inspiration tant scientifiquement qu'humainement parlant.

J'éprouve aussi une immense gratitude envers Juliette Jouhet et Maryse Block qui ont dirigé ce travail. Je les remercie infiniment pour le soutien, la disponibilité, et l'aide qu'elles m'ont apportés tout au long de la thèse. La réflexion qu'elles m'ont apportée, l'envie de faire avancer la Science, la joie presque enfantine de Maryse devant les résultats positifs et la recherche du "bon côté des choses" devant les résultats négatifs de la part de Juliette seront des choses qui resteront accrochées à ma mémoire quelle que soit la suite de ma carrière.

Merci aussi à Denis Falconet pour son aide plus que précieuse pour la microscopie confocale et électronique, pour son émerveillement devant ses images du vivant, sa joie de vivre, de vivre la science et sa bonhommie qui m'ont permis d'avoir le sourire même dans les moments difficiles.

Un énorme merci à Florian et Guillaume qui m'ont supporté dans les deux sens du terme tout au long de cette thèse. Vraiment merci les copains sans vous ça n'aurait pas été pareil. Plus que des collègues j'ai trouvé des amis et je sais qu'on se reverra.

Merci à Chloé stagiaire de M1 qui aura été une bouffée d'oxygène et qui aura fait énormément avancer ce projet.

Merci à Catherine pour son aide à la paillasse sans laquelle ce projet n'aurait pas aboutit.

Merci à Stéphane et Claude les voisins de paillasses qui m'auront fait rire et mis du baume au cœur au cours des longues journées à "pipeter comme un …"

Je remercie également ma famille qui m'a soutenu dans mes choix.

Un merci à tous les membres du PCV dont la compagnie aura fait de cette thèse un moment inoubliable.

SOMMAIRE

Synthèse Bibliographique 1

I. Composition et organisation structurale des glycérolipides chez les plantes 2

1. Les glycérolipides 2

2. La composition des compartiments membranaires 4

3. La ségrégation latérale des lipides: les macros et microdomaines 5

4. L'asymétrie des membranes 7

II. Synthèse des lipides chez les plantes. 8

1. Synthèse des précurseurs des lipides 8

a. Synthèse des acides gras chez les plantes 8

b. Néosynthèse de l'acide phosphatidique 10

c. Synthèse du CDP-DAG 11

d. Synthèse du DAG 12

2. Synthèse des phospholipides 13

a. Synthèse de la phosphatidylcholine 13

b. Synthèse de la phosphatidyléthanolamine 14

3. Synthèse des galactolipides 14

a. Synthèse du MGDG 15

b. Synthèse du DGDG 16

c. Désaturation des galactolipides 17

4. L'édition des acides gras 17

a. La désaturation de la phosphatidylcholine 17

b. L'édition des acides gras de la phosphatidylcholine 18

III. Le trafic lipidique pour approvisionner la synthèse des galactolipides 21

1. Les transferts intermembranaires 22

a. Le trafic vésiculaire 22

b. Transfert par contact intermembranaire 24

1. Zones de contact intermembranaire : le réticulum endoplasmique, un organite central . 24

2. Protéines et mécanismes de transfert de lipide au niveau des MCS. 26

3. Le cas particulier des contacts ER-Chloroplaste. 28

2. Les transferts intramembranaires 29

a. Transferts ATP indépendants 29

b. Floppases ATP dépendantes 30

IV. Les ATPases de type P_4 31

1. Les ATPases de type P 31
a. Phylogénie des ATPases de type P 31
b. Domaines structuraux des ATPases de type P 31
c. Mécanisme catalytique des ATPases de type P 33
2. Les ATPases de type P_4 34
a. Phylogénie des ATPases de type P_4 36
b. Mécanisme catalytique 36
c. CDC50 et ALIS, les sous unités β des ATPases de type P_4 39
d. Rôle et fonction des ATPases de type P_4 41
3. La famille des ALA chez *Arabidopsis thaliana* 43
a. ALA1 43
b. ALA2 44
c. ALA3 44
d. ALA6 et ALA7 44
4. ALA10, une ATPase de type P_4 remarquable 45
a. Données bibliographiques concernant ALA10 45
b. Expression d'ALA10 en réponse aux modifications de la synthèse des galactolipides. 46
1. ALA10 et l'inhibition de synthèse du MGDG par la Galvestine-1 46
2. ALA10 et la carence en phosphate. 47
Matériel et Méthodes 48
I. Matériel végétal 49
1. Obtention des lignées d'insertion d'*Arabidopsis thaliana* 49
2. Culture des plantes sur terreau 49
3. Culture des plantes in vitro 49
4. Culture de cellules d'*Arabidopsis thaliana* 50
5. Culture pour sélectionner des plantes transformées 50
II. Analyse phénotypique de la croissance et du développement 50
1. Mesure de la croissance 50
2. Mesure du délai de floraison 51
3. Observation de l'accumulation d'amidon sur plantes entières 51
III. Mesure activité photosynthétique 51
IV. Techniques d'étude des acides nucléiques 52
1. Techniques d'analyse des plants d'*Arabidopsis thaliana* mutés par insertion 52
a. Extraction de l'ADN génomique des plantules 52
b. Amplification in vitro de fragments d'ADN 52
c. Amorces utilisées pour le génotypage des mutants ala10, alis1, alis5, klcr2 et pub11 53

2. Techniques de clonage d'ADN en système procaryote 54
a. Souches bactériennes utilisées 54
b. Vecteurs d'expression utilisés et obtention des constructions 54
c. Extraction de plasmides présents dans les bactéries 55
d. Extraction de fragments d'ADN présents dans un gel d'agarose 55
e. Insertion des ADNc dans les vecteurs 55
f. Transformation des bactéries 56
V. Expression de protéines fusionnées à la GFP 56
1. Obtention et transformation des protoplastes d'Arabidopsis 56
2. Transformation et expression stable chez *Arabidopsis thaliana* 57
VI. Analyse par microscopie 57
1. Microscopie confocale 57
2. Visualisation des structures membranaires subcellulaires par microscopie électronique en transmission 58
3. Analyse des images de microscopie électronique par Image J 58
VII. Analyse de lipides 58
1. Extraction selon Folch 58
2. Séparation et dosage des lipides 59
3. Chromatographie en phase gazeuse 59
4. Spectrométrie de masse 60
VIII. Analyse des protéines 60
1. Dosage des protéines 60
2. Analyse des protéines par électrophorèse 61
3. Electro-transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose 61
4. Immuno-marquage 61
5. Immunopurification (IP) sur colonne MACS4 62
6. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et Western Blot 62
7. Immunomarquage des protéines lors des immunopurifications 62
Chapitre I 64
ALA10 et l'homéostasie lipidique chez *Arabidopsis thaliana* 64
1. Analyse de la localisation de ALA10 65
a. Analyse de la séquence 65
b. Fractionnement subcellulaire 65
c. Analyse des interactions ALA10-ALIS par BiFC 66
d. ALA10, une localisation différentielle fonction du niveau d'expression de ALIS1 et ALIS5 69
e. Surexpression de ALA10-GFP in planta 70

f. Discussion sur la localisation d'ALA10 72
2. Effet d'ALA10 sur la Balance MGDG/PC 73
a. Effet de l'expression d'ALA10 sur la croissance 73
b. Effet d'ALA10 sur la balance MGDG/PC 74
c. ALA10 et la photosynthèse 78
3. ALA10 et le métabolisme de la PC. 81
a. Effet d'ALA10 sur la composition en PC des chloroplastes 81
b. Effet d'ALA10 sur la désaturation de la PC cellulaire. 83
c. Analyse par BiFC de l'interaction de ALA10 avec FAD2 84
4. Discussion 85
Chapitre II 90
Le rôle des ALIS dans la fonction d'ALA10 90
1. Expression des ALA et des ALIS. 91
2. Observations microscopiques des plantes mutantes pour ALA10 et les ALIS 96
a. Observation en microscopie confocale des doubles surexpresseurs L2ALIS1 et L2ALIS5 96
b. Observation en microscopie électronique 98
3. Phénotype des plantes mutantes ala10, alis1, alis5 105
a. Phénotype de croissance en fonction du cycle jours nuits 105
b. Phénotype lipidique des lignées mutantes pour ALA10, ALIS1 et ALIS5 106
1. Teneur et composition en acides gras 106
2. Composition lipidique globale 109
c. Analyse du profil d'acide gras du MGDG, de la PC et de la PE 109
1. Profil d'acide gras du MGDG 109
2. Profil d'acide gras de la PC 110
d. Discussion sur le phénotype lipidique 112
4. ALA10, les ALIS, et les variations journalières de la PC. 113
a. Impact d'ALA10 et des ALIS sur la floraison 114
5. Discussion 116
Chapitre III 119
La régulation post-traductionnelle d'ALA10 119
1. La recherche d'interactants d'ALA10 120
2. PUB11, une ubiquitine ligase E3, interagit en levure et *in planta* avec ALA10. 122
3. La régulation post-traductionnelle d'ALA10 125
a. La régulation transcriptonnelle d'ALA10 et PUB11 125
b. ALA10 est régulée post-traductionnellement au cours de la journée 126
c. L'ubiquitination d'ALA10 127

d. PUB11 et la localisation d'ALA10 131
4. Discussion 134
Chapitre IV 137
Conclusion: vers un nouveau modèle 137
1. Conclusion 139
2. Un modèle spatial et temporel. 142
3. Perspectives 145
Annexes: 170

Abréviations

ACCase : complexe Acétyl-CoA Carboxylase
ACP : Acyl Carrier Protein
ACS : Acétyl-CoA Synthétase
ALA: Aminophospholipid ATPase
ALIS: ALA interacting subunit
AP : Acide Phosphatidique
C16 : Acide gras à 16 atomes de carbone
C18 : Acide gras à 18 atomes de carbone
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CDP : Cytidine Diphosphate
CFP: Cyan Fluorescent Protein
CoA : Coenzyme A
CTP : Cytidine Triphosphate
DAG : Diacylglycérol
DGDG : Digalactosyldiacylglycérol
DPG : Diphosphatidylglycérol
FAD: Fatty acid desaturase
FAS : Fatty Acid Synthase
FAT: Fatty Acid Thioestherase
GFP: Green Fluorescent Protein
LB : Luria-Broth
MGDG : Monogalactosyldiacylglycérol
MOPS : Acide N-morpholino-3-propane sulfonique
MS : Murashige et Skoog
NBD-phospholipide:*NBD*=1-Palmitoyl-2-(6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4- yl)amino]hexanoyl)-sn-glycero-3-phospholipide.
PC : Phosphatidylcholine
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PI : Phosphatidylinositol
PS : Phosphatidylsérine
PSI: Photosystème I
PSII: Photosystème II
PUB: Plant U-Box Protein
SL: Sphingolipides
SQDG : Sulfoquinovosyldiacylglycérol
YFP: Yellow Fluorescent Protein

Synthèse Bibliographique

I. Composition et organisation structurale des glycérolipides chez les plantes

1. Les glycérolipides

Les lipides sont essentiels à tous les organismes vivants. Leur fonction vitale résulte de leur caractéristique d'hydrophobicité. Leur capacité à s'auto-organiser en bicouche en milieu aqueux permet la délimitation par des membranes entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule mais aussi entre les différents compartiments intracellulaires des organismes eucaryotes. Les membranes formées constituent une barrière au travers de laquelle l'eau et la plupart des métabolites ne peuvent pas passer librement. En plus d'un rôle de séparation, cette organisation constitue un support pour la localisation de protéines ayant un domaine hydrophobe et qui de par leurs activités vont permettre un dialogue entre les compartiments. Cette double fonction serait d'ailleurs une condition *sine qua non* de l'apparition de la vie comme discuté par (Oberholzer et al., 1999).

Chez les organismes vivants, la majorité des lipides membranaires sont des glycérolipides. Cette classe de lipides est formée à partir d'un glycérol. Sur ce glycérol, les atomes de carbone en position *sn*-1 et *sn*-2 sont liés à des acides gras ce qui génère un diacylglycérol. La position *sn*-3 peut quant à elle porter soit une tête polaire constituant un glycérolipide polaire, soit un troisième acide gras formant un triglycéride (Figure 1).

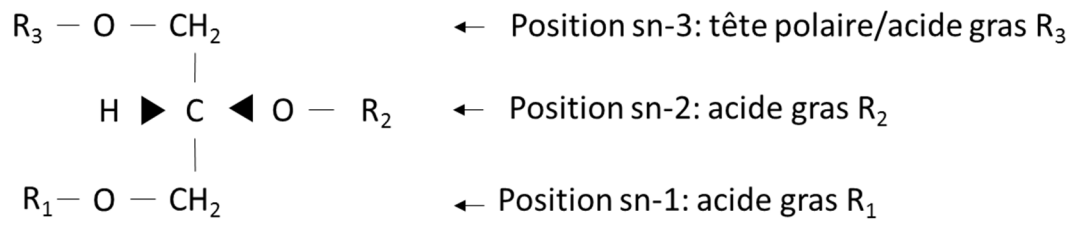


Figure 1 : Nomenclature sn (Stereospecific Number) du glycérol des glycérolipides polaires et des triglycérides. *Dans ce mémoire, les acides gras seront qualifiés par leur nombre de carbones suivi du nombre de double liaisons ou désaturations (ex : C16:0 : acides gras à 16 carbones et sans double liaison).*

Les triglycérides sont considérés comme des lipides de réserve, absent des membranes, que l'on trouve essentiellement au niveau de corps lipidiques. En ce qui concerne les glycérolipides polaires, leur tête polaire hydrophile donne un caractère amphiphile à ces lipides leur permettant de générer des bicouches, où les acides gras se regroupent dans un espace hydrophobe et les têtes polaires font face à l'eau de part et d'autre de la bicouche (Figure 2).

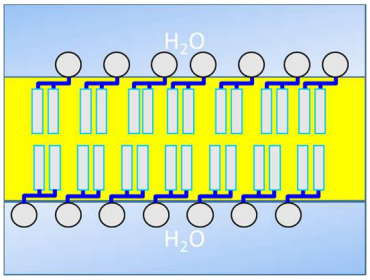


Figure 2 : Représentation schématique des bicouches glycérolipidiques. *Les disques gris représentent les têtes polaires, en bleu foncé le squelette glycérol, les rectangles gris représentent les acides gras. L'espace hydrophobe est en jaune, les compartiments aqueux sont en bleu clair.*

Les glycérolipides polaires comportent deux grandes classes en fonction de leur tête polaire. La première classe contient un groupement phosphate constituant les phopholipides. L'acide phosphatidique (AP) correspond à un diacylglycérol sur lequel a été estérifié un phosphate en *sn-3*. Sur ce groupement phosphate peut être lié une sérine générant la phosphatidylsérine (PS), une éthanolamine donnant la phosphatidyléthanolamine (PE), une choline générant la phosphatidylcholine (PC), un glycérol donnant le phosphatidylglycérol (PG), un acide phosphatique donnant du diphosphatidylglycérol ou cardiolipine (DPG), un groupement inositol générant les phospho-inosistides (PI). La deuxième classe regroupe des glycolipides dont la tête polaire ne comporte pas de phosphate. Cette tête polaire peut comporter un sulfoquinovose donnant le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG), ou un ou deux galactoses formant ainsi le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG), respectivement (Figure 3). Cette deuxième classe de lipides est très importante chez les organismes photosynthétiques où ils sont les principaux composants des membranes photosynthétiques.

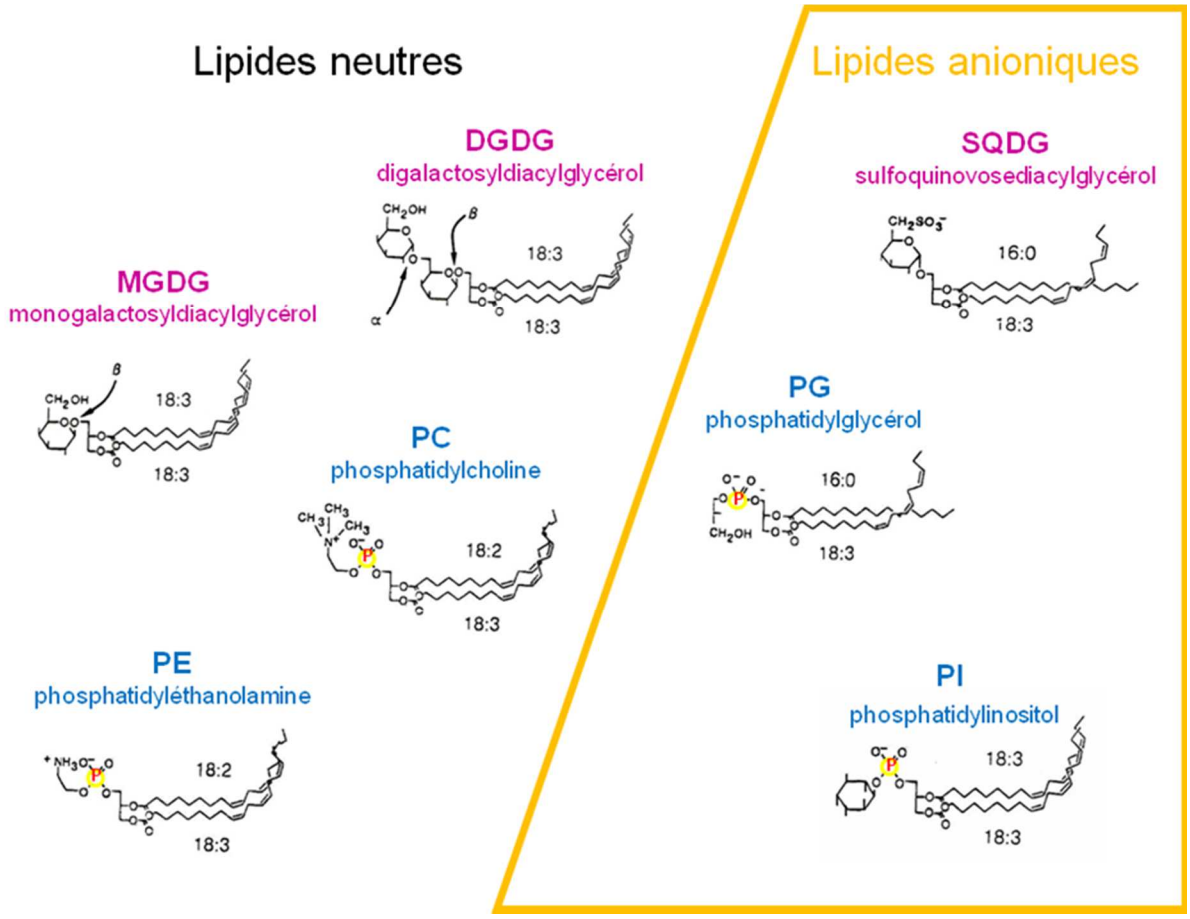


Figure 3: Structure des glycérolipides polaires principaux chez les plantes supérieures. *En fonction de leurs caractéristiques chimiques et de leurs structures, les glycérolipides peuvent être regroupés en différentes catégories, par exemple les lipides polaires neutres au pH physiologique: DGDG, MGDG, PC, PE par opposition aux lipides anioniques dans les mêmes conditions: SQDG, PG, et PI (cerclés en jaune). On peut aussi les classer en fonction de la présence ou non d'un phosphate au sein de la tête polaire. On distingue ainsi les phospholipides (en bleu) tel que PE, PC, PG et PI des glycolipides comme le SQDG, le MGDG et le DGDG; les deux derniers regroupés en tant que galactolipides du fait de la présence du galactose formant la tête polaire.*

En plus de la diversité des têtes polaires que peuvent arborer les glycérolipides, les chaines d'acides gras portées en position *sn*-1 et *sn*-2 peuvent avoir une longueur et un nombre de double liaisons (ou insaturations) variables. Chez les plantes supérieures, on trouve essentiellement des acides gras à 16 ou 18 atomes de carbone avec une, deux ou trois doubles liaisons. Ces doubles liaisons en *cis* forment

un coude dans la structure de l'acide gras lui permettant une rotation autour de l'axe formé par les autres atomes de carbone ce qui désordonne partiellement la membrane et augmente ainsi sa fluidité.

La combinaison des têtes polaires et des acides gras amène à un répertoire en théorie possible de 448 glycérolipides majoritaires différents. Ceci suggère une grande complexité des membranes formées, d'autant plus que chaque tête polaire a des caractéristiques propres tant en termes de charge électronique, d'encombrement stérique, ou de réactivité vis-à-vis de son environnement et que la longueur des acides gras et le nombre d'insaturations jouent aussi sur la structure des membranes, le tout impactant au final sur l'activité des protéines membranaires.

2. La composition des compartiments membranaires

Chez les eucaryotes, chaque organite se caractérise comme un compartiment subcellulaire ayant des fonctions spécifiques et chaque membrane délimitant un organite a une composition lipidique spécifique, extrêmement stable d'un type cellulaire à l'autre, et même relativement conservée d'un organisme à l'autre. Cependant lors de certains stress, les compositions de ces membranes peuvent être modifiées indiquant une certaine plasticité d'adaptation (voir paragraphe suivant). Les compositions citées dans ce paragraphe sont issues d'études sur des plantes considérées comme non stressées (Tableau 1).

Membranes	AP	PC	PE	PG	PI	PS	DGP	MGDG	DGDG	SL
Enveloppe plastidiale										
Membrane externe	_	32	0	10	5	0	0	17	29	6
Membrane interne	_	0	0	9	1	0	0	55	30	5
Thylacoïdes	_	0	0	7	1		0	57	27	7
Endomembranes										
RE	0,6	49,6	27,3	6,5	6,8	3,2	1,4	0,9	3,7	_
Membrane plasmique	5-20	25-45	30-40	2-6	2-8	3-12	0	0-1	0-2	_
Tonoplaste	1,7	37,6	37,8	3,3	12,8	3,4	_	0,8	2,6	_
Peroxysome	_	57,7	20,8	11,2	10,2	_	_	_	_	_
Membranes mitochondriales										
Membrane externe	_	59,8	25,2	3,4	11,6	_	_	_	_	_
Membrane interne	_	42,1	38,2	1,9	5,0	_	12,8	_	_	_

Tableau 1: Composition en glycérolipides de différents compartiments membranaires de cellules végétales. *Données recueillies dans différents tissus d'épinard et d'Arabidopsis thaliana. Les proportions sont en mol% des glycérolipides de la membrane. Les données sont tirées de: RE (Hartmann and Benveniste 1987) (Uemura and Steponkus, 1994), membrane plasmique (Uemura and Steponkus, 1994), membranes plastidiales (Douce et al., 1990(Joyard et al., 1990; Maréchal et al., 1997), tonoplaste (Yoshida et al.,1986; Tavernier et al., 1993), péroxysome (Chapman and Trelease, 1991); mitochondries (Donaldson and Beevers, 1977; Guillot-Salomon et al., 1997) . Tableau issu de (Moreau et al., 1998). AP: acide phosphatidique, PC phosphatidylcholine, PE phosphatidyléthanolamine, PG, phosphatidylglycérol, PI: phosphoinositide, PS phosphatidylserine, DPG Diphosphatidylglycérol ou cardiolipine, MGDG monogalactosyldiacylglycérol, DGDG digalactosyldiacylglycérol, SL: sulfolipides.*

La différence de composition la plus remarquable est celle qui existe entre les membranes chloroplastiques, composées majoritairement de glycolipides, et les endomembranes composées en majorité de phopholipides. Au-delà de cette différence drastique, des différences plus fines apparaissent lorsque qu'on étudie séparément les compositions des membranes de ces compartiments.

Concernant les endomembranes, elles sont majoritairement composées de PC et de PE. La membrane du réticulum endoplasmique (RE) contient aussi du PG et du PI autour de 6 mol%. La membrane plasmique se démarque par sa forte teneur en AP de 5 à 20 mol% et en PS de 3 à 12 mol% (Moreau et al., 1998). L'appareil de Golgi a une composition qui parait être intermédiaire entre la membrane plasmique et le RE peut-être du fait de l'intense trafic vésiculaire qui existe entre ces 3 organites, qui générerait un trafic de lipidique aspécifique. Le tonoplaste est remarquable par sa teneur élevée en PI à 13 mol% et par le fait que c'est le seul compartiment contenant un niveau quasiment égal de PC et de PE autour de 38 mol%. Le peroxysome est le compartiment endomembranaire contenant les plus grandes proportions de PC et de PG respectivement 58 mol% et 11 mol%.

Les membranes mitochondriales diffèrent entre elles et avec le reste de la cellule, même si la PC et la PE restent les lipides majoritaires. Le plus évident est la présence de 13 mol% de DPG ou cardiolipine dans la membrane interne. Ce lipide n'est présent que dans cette membrane et n'est retrouvé nulle part ailleurs dans la cellule végétale. La membrane externe de la mitochondrie se caractérise par de fortes proportions de PC et de PI, respectivement 60 et 12 mol%.

Les membranes chloroplastiques sont très différentes des autres membranes de la cellule. En effet, seules les membranes plastidiales contiennent des glycolipides à des niveaux importants. On trouve des sulfolipides qui ne sont détectés que dans ces membranes où ils représentent autour de 6 mol% des glycérolipides. Les galactolipides représentent la majorité des lipides des membranes plastidiales. Les galactolipides sont considérés comme caractéristiques des membranes plastidiales mais il est à noter qu'on peut aussi en retrouver dans certaines endomembranes (Tableau 1), lors de certains stress comme la carence en phosphate, le DGDG peut remplacer la PC dans certaines endomembranes. Par ailleurs, les membranes plastidiales sont remarquables par l'absence de PE et de PS ainsi que par une teneur relativement élevée en PG (7 à 10 mol% des glycérolipides). Concernant la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste, elle se distingue des autres membranes chloroplastiques par le fait qu'elle contient de la PC. Il est à noter que cette PC représente ici 32 mol% des lipides et que (Dorne et al., 1985) ont montré que cette PC n'est présente qu'au niveau du feuillet cytosolique de cette membrane (voir partie I.4: l'asymétrie des membranes). D'autre part, la membrane externe comporte 5 mol% de PI contre seulement 1 mol% dans les autres membranes plastidiales. La membrane interne et les thylacoides ont des compositions relativement proches avec une majorité de MGDG (de l'ordre de 56 mol%) et de DGDG (de l'ordre de 26 mol%) et des teneurs en PG et SL similaires à celles retrouvées dans la membrane externe de l'enveloppe.

3. La ségrégation latérale des lipides: les macros et microdomaines

Outre les différences de composition, parfois majeures, qui existent entre les différentes membranes de la cellule, certaines membranes présentent une hétérogénéité latérale avec des domaines enrichis en certains lipides. En effet, depuis le modèle de mosaïque fluide proposé par (Singer and Nicolson,

1972) dans lequel les lipides sont répartis de façon uniforme au sein des membranes, le paradigme a évolué.

Il a été montré que la fluidité des membranes composées de glycérolipides est modifiée en fonction de la longueur des chaines d'acide gras, du nombre de doubles liaisons portées par celles-ci et de la nature de la tête polaire (Seu et al., 2006). De plus les membranes végétales, principalement la membrane plasmique, contiennent des sphingolipides et des stérols qui ont la particularité de s'assembler en phase liquide ordonnée. La phase liquide ordonnée limite très fortement les mouvements de lipides les uns par rapport aux autres alors que dans la phase liquide désordonnée, les lipides peuvent diffuser librement dans le plan de la membrane. Le modèle de la mosaïque fluide postule que tous les lipides au sein d'une même membrane sont en phase liquide désordonnée, ainsi ce modèle n'est pas cohérent avec la composition des membranes, notamment celle de la membrane plasmique des cellules végétales. Ainsi dans des mixtures de lipides trouvés dans les membranes végétales, on assiste à une séparation de phase formant des domaines enrichis en stérols et sphingolipides (Silvius, 2005).

A l'origine, l'existence de ces domaines a été suggérée par l'indentification d'une phase de faible densité, insoluble au détergent Triton X-100, issue de membranes plasmiques de cellules de Tabac (Peskan et al., 2000). Ces fractions ont ensuite été identifiées chez *Arabidopsis thaliana* (Mongrand et al., 2004) et décrites comme étant enrichies en certains lipides et protéines (Borner et al., 2005; Mongrand et al., 2004; Shahollari et al., 2005). Concernant la composition lipidique ces fractions sont enrichies en stérols, stérylglycosides et stérylglycosides acylés (Lefebvre et al., 2007), (Furt et al., 2007),(Laloi et al., 2007) . Ces fractions sont appauvries en glycérolipides, et les glycérolipides retrouvés dans ces phases insolubles présentent un profil d'acides gras significativement moins désaturé que celui retrouvé généralement dans les membranes (Laloi et al., 2007). Concernant les protéines présentes dans ces fractions elles représentent en termes d'abondance 5 à 10% de la totalité des protéines de la membrane plasmique (Mongrand et al., 2010), et sont enrichies en protéines de signalisation comme les récepteurs kinase avec répétition riche en leucine (Shahollari et al., 2005) . Les modèles mathématiques suggèrent une taille pour ces radeaux membranaires allant de 10 à 100 nm (Sharma et al., 2004), (Varma and Mayor, 1998). Cela a ensuite été confirmé par l'observation en microscopie électronique à transmission de vésicules, issue de membranes plasmiques de tabac, immunomarquées à l'or avec des anticorps reconnaissant des protéines retrouvées dans les fractions non solubles. Ces observations révèlent notamment des agrégations de remorines, protéines marqueur des radeaux membranaires, dans des microdomaines d'environs 70 nm de diamètre (Furt et al., 2010). Ces microdomaines, ont été caractérisés au niveau de la membrane plasmique de cellules d'*Arabidopsis thaliana* et de tabac (Mongrand et al., 2004), pour revue (Mongrand et al., 2010), des plasmodesmes (Raffaele et al., 2009a; Raffaele et al., 2009b) et du tube al pollinique (Liu et., 2009), ils peuvent aussi être induits en réponse à certains pathogènes (Haney et al., 2011), (Malinsky et al., 2013).

Au niveau du plaste, deux types de ségrégations latérales semblent exister: une au niveau des thylacoïdes, l'autre au niveau de la membrane interne de l'enveloppe siège de la synthèse du MGDG. En effet la synthèse de thylacoïdes dans les chloroplastes en phase de maturation, est extrêmement intense et l'apport en MGDG nécessaire à la formation des thyllacoïdes est très rapide. Or MGD1 l'enzyme responsable de la synthèse de la majorité du MGDG à la particularité d'avoir une haute affinité avec son substrat et sa liaison aux membranes est inhibé par le DGDG. De plus cette protéine

interagit avec elle-même formant des structures réticulées au niveau des membranes (Sarkis et al., 2014). Ainsi la vitesse de synthèse du MGDG est cohérente avec un enrichissement local en MGDG au niveau de cette membrane. Par ailleurs, le MGDG, lorsque majoritaire au sein d'une membrane, ne forme pas une bicouche mais des structures en micelles inversées, ou hexagonale II (Jouhet, 2013), ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'un transfert non vésiculaire et non lamellaire des lipides entre la membrane interne du plaste et les thylacoïdes pendant cette phase de maturation des chloroplastes (Deme et al., 2014), (Bastien et al., 2016).

Enfin, l'étude de la composition lipidique des thylacoïdes menée par (Gounaris et al., 1986) a révélé que différentes zones des membranes des thylacoïdes, les granas et les stromas lamellae, ne présentent pas la même composition lipidique. Les granas sont enrichis en MGDG, PG et SQDG, par rapport aux stroma lamellae qui ont une proportion plus importante de DGDG. Ainsi les granas ont une proportion MGDG/DGDG =2,77 alors que les stroma lamellae présentent un ratio de 1,15. Ces deux zones membranaires sont particulièrement riches en protéines, les stroma lamellae sont enrichies en photosystème I (PSI) alors que les granas sont enrichis en photosystème II (PSII). Les mécanismes de ségrégation des lipides et des protéines au sein de ces membranes sont encore à l'étude mais différents résultats indiquent que la ségrégation pourrait résulter de l'interaction spécifique des PSII avec le MGDG comme discuté par (Stys et al., 1995); (Rojdestvenski et al., 2002). Il est en effet connu que le PSII interagit spécifiquement avec le MGDG et que le MGDG est nécessaire au fonctionnement du PSII (Mizusawa and Wada, 2012). Il a aussi été montré que le DGDG présent au sein des grana permet à ces membranes de s'organiser en disques aplatis et accolés (Dormann et al., 1995); (Holzl et al., 2009), pour revue (Bastien et al., 2016).

4. L'asymétrie des membranes

Certaines membranes présentent par ailleurs une asymétrie de composition entre les deux feuillets lipidiques qui les composent. D'abord mise en évidence sur des modèles animaux, au niveau de la membrane plasmique des globules rouges murins, puis sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*, cette asymétrie existe aussi chez les plantes. Chez la souris et la levure, la membrane plasmique présente une remarquable asymétrie de composition puisque le feuillet cytosolique est enrichi en PS, PE et PI et que la PS est absente du feuillet extracellulaire, ce feuillet étant par contre enrichi en PC (Bretscher, 1972). Une asymétrie a aussi été montrée au niveau de l'appareil de Golgi et des endosomes tardifs (Devaux and Morris, 2004); (Daleke, 2007). Chez les plantes, la même distribution asymétrique des lipides a été décrite au niveau de la membrane plasmique et des vésicules golgiennes (O'Brien et al., 1997). L'asymétrie a d'abord été décrite comme étant la conséquence de transferts passifs des lipides dus à la différence de charge et de composition entre les milieux délimités par les membranes. Cependant, excepté pour le DAG, la translocation (ou le flip) spontanée du lipide d'un côté à l'autre de la bicouche est un phénomène trop long pour engendrer l'asymétrie (Figure 4) (Holthuis and Levine, 2005). Comme nous le détaillerons dans le troisième chapitre de cette introduction, cette asymétrie résulte principalement de l'activité de flippases utilisant l'ATP comme source d'énergie pour transporter les lipides à l'encontre de leur gradient de concentration pour revue (Coleman et al., 2013).

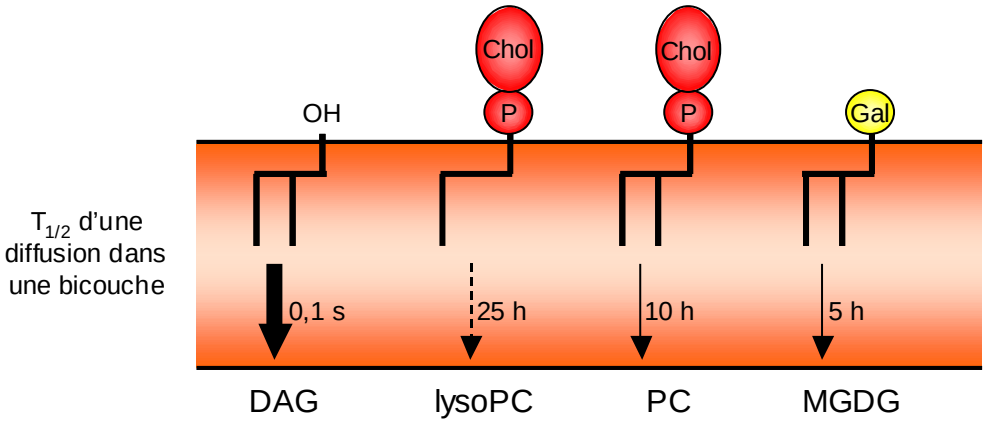


Figure 4 : Diffusion des lipides au sein des bicouches lipidiques. *La figure montre les $t_{1/2}$ des mouvements spontanés des lipides (temps nécessaire à la translocation de la moitié des lipides d'un côté à l'autre de la membrane), d'après (Holthuis and Levine, 2005). La flèche large indique les mouvements rapides alors que la flèche en pointillés indique les mouvements lents. P : phosphate, Chol : choline, Gal : galactose.*

Chez les plantes, une autre membrane présente une très forte asymétrie: la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste. En effet cette membrane est composée à 30 mol% de PC et celle-ci est présente exclusivement dans le feuillet externe de la membrane, comme l'ont montré les expériences de traitement à la phospholipase C de chloroplastes d'épinard intacts (Dorne et al., 1985; Dorne et al., 1990). La PC est donc le lipide majoritaire du feuillet externe de l'enveloppe du plaste alors qu'elle est exclue du feuillet interne. Pourtant, aucune flippase n'a à ce jour été décrite comme étant localisée dans cette membrane. Cette asymétrie pourrait résulter d'autres mécanismes liés à l'import chloroplastique de la PC et à son transport intermembranaire comme nous le verrons plus loin. Etant donné sa faible propension à flipper spontanément, la PC arrivant au niveau du feuillet externe de l'enveloppe du plaste pourrait rester à demeure sur ce feuillet.

L'asymétrie transversale est d'une grande importance physiologique. Elle s'est révélée très importante dans les cellules animales, où la PS présente dans le feuillet extracellulaire est reconnue par les macrophages comme marque de déclenchement de l'apoptose (Fadok et al., 1998). Il a aussi été montré chez différents organismes, levures, plantes et animaux, que l'asymétrie des membranes était un facteur déterminant de la courbure des membranes avec des conséquences majeures sur les mécanismes de formation des vésicules et d'endocytose (McMahon and Gallop, 2005), (Pomorski et al., 2003), (Graham and Kozlov, 2010); pour revue (Montigny et al., 2016a).

II. Synthèse des lipides chez les plantes.

1. Synthèse des précurseurs des lipides

a. Synthèse des acides gras chez les plantes

La synthèse des acides gras débute dans le stroma des chloroplastes par la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase)(Knowles, 1989). Le squelette malonyl du malonyl-CoA est ensuite transféré sur l'Acyl Carrier Protein (ACP) par la malonyl-CoA:ACP malonyltransférase (MAT)(Harwood, 2005; Harwood, 1996). Cette réaction est responsable de la formation du malonyl-ACP qui est le substrat support pour allonger les chaînes d'acides gras de 2 carbones en 2 carbones. Les complexes enzymatiques FAS (Fatty Acid Synthetase) catalysent l'élongation des acides gras (Slabas and Fawcett, 1992). Ces complexes contiennent quatre protéines qui catalysent quatre réactions en chaines pour élonguer un acide gras de deux carbones supplémentaires : une enzyme de condensation (β -ketoacyl-ACP synthase, KAS) une première

réductase (β -ketoacyl-ACP reductase), une déhydratase (β -hydroxyacyl-ACP dehydrase) et une seconde réductase (enoyl-ACP reductase). Chez les plantes, les deux réductases et la déhydrase sont conservés dans tous les complexes FAS mais il existe 3 isoformes de la β-ketoacyl synthétase : KASI, KASII et KASIII qui sont responsables de la spécificité de substrat. La première réaction d'élongation des acides gras est catalysée par KASIII qui utilise comme substrat le malonyl-ACP et l'acétyl-CoA. Après les deux réductions et la réaction de déshydratation cela produit un acide gras à 4 carbones, qui est mal pris en charge par KASIII mais est un bon substrat pour KASI. Les condensations suivantes de C4 à C16 sont donc catalysées par KASI. Enfin KASII utilise préférentiellement palmitoyl-ACP par rapport au myristoyl-ACP, son action permet la formation du stéaroyl-ACP. Ainsi le ratio final 16C/18C est déterminé par l'action de KASII (Walsh et al., 1990) .Les stéaroyl-ACP (18:0) sont désaturés en oleoyl-ACP (18:1), par des désaturases solubles du stroma. Les acyl-ACP ainsi produit peuvent soit être utilisés directement par les acyl-transferase de la voie de Kornberg-Pricer pour produire de l'AP de forme procaryote (Harwood, 2005; Harwood, 1996; Somerville and Browse, 1991). Alternativement, les Acyl-ACP ainsi produits peuvent être hydrolysés par des acyl-ACP thioesterases formant des acides gras libres. Cette activité enzymatique peut être effectuée par deux classes de protéines FATA et FATB localisées dans l'enveloppe interne des plastes. Chez *Arabidopsis thaliana* deux gènes codant pour des FATA, qui hydrolysent préférentiellement les oleoyl-ACP (18:1) ont été identifiés, alors qu'un seul gène codant pour une FATB, qui a une plus forte activité avec les acyl-ACPsaturés, a été identifié (Harwood, 2005). Les acides gras (18:1 ou 16:0) ainsi produits peuvent ensuite être transférés par diffusion libre ou facilitée vers la membrane externe de l'enveloppe. Récemment un acteur de ce transfert a été décrit: la protéine FAX1, localisée dans la membrane interne de l'enveloppe, et dont le mutant KO présente un défaut majeur de synthèse des lipides dans le RE, suggérant son rôle dans l'export des acides gras et l'existence d'une diffusion libre ou d'un autre mécanisme de transfert des lipides entre ces membranes (Li et al., 2015).

Les processus de transfert des acides gras libres et de formation d'acyl-CoA s'effectuent probablement de la manière suivante: Le modèle actuel propose qu'une partie des acyl-ACP synthétisés dans les plastes soient hydrolysés par des acyl-ACP-thioesterases présentes dans la membrane interne de l'enveloppe des plastes. Les acides gras libres ainsi produits sont ensuite transférés vers la membrane externe de l'enveloppe où ils seraient réactivés en acyl-CoA par une acyl-coA synthètase (ACS) (Figure 5) (Koo et al., 2004). Les acides gras sont ensuite convertis en Acyl-CoA par une ou plusieurs Long Chain Acyl-CoA synthases (LACS) dont une, LACS9, a été localisée dans cette membrane.

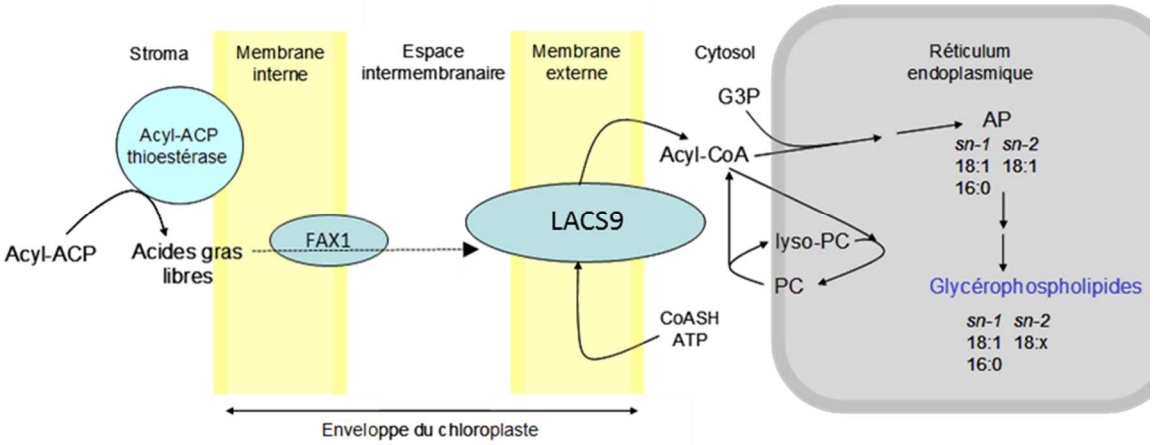


Figure 5: Export des acides gras du plaste vers le cytosol et utilisation pour la formation des phospholipides de type eucaryote. *Le mécanisme de transfert des acides gras libres du stroma vers la membrane externe reste encore mal compris. Il pourrait combiner l'action d'une acyl-ACP thioestérase et d'une acyl-CoA synthétase via FAX1 qui a récemment été caractérisé. Il s'agit d'une protéine de la membrane interne des chloroplastes dont l'activité est déterminante pour la production des glycérolipides membranaire dans le RE (Li et al., 2015). Un transporteur potentiel d'acides gras appartenant à la famille des transporteurs ABC (At1g54350) a été identifié dans le génome d'Arabidopsis thaliana (Beisson et al., 2003) et pourrait avoir pour rôle de transférer les acides gras libres jusqu'à l'ACS. Le transport pourrait se produire au niveau de zones de contact entre la membrane interne et la membrane externe de l'enveloppe. Parmi les neuf ACS d'acides gras à longue chaîne caractérisées chez Arabidopsis thaliana LACS9 a été identifiée comme l'ACS prépondérante des plastes et est un bon candidat pour le transfert des acides gras des plastes vers le cytosol (Schnurr et al., 2002).*

b. Néosynthèse de l'acide phosphatidique

L'acide phosphatidique (AP) n'est pas un lipide abondant au sein de la cellule végétale (de l'ordre de 1% des lipides totaux chez *Arabidopsis thaliana*), cependant il est d'une importance capitale du fait de son double rôle métabolique et signalétique. L'AP est le précurseur de la synthèse de tous les glycérolipides mais il a aussi un rôle de régulateur de l'activité de différentes protéines membranaires telles que MGD1 (Dubots et al., 2010). Par ailleurs, du fait de sa tête polaire relativement petite, il a une forme conique qui tend à déstabiliser les bicouches lipidiques et à favoriser la courbure des membranes, voire les phénomènes de fusion membranaire (Roth, 2008; Shemesh et al., 2003). La néo-synthèse de l'AP peut se faire selon deux voies: l'une plastidiale nommée voie procaryote, l'autre au niveau du RE nommée voie eucaryote. Du fait de la sélectivité des différentes acyltransférases mises en jeu pour cette synthèse, les lipides issus de ces voies sont distinguables par l'acide gras porté en position *sn-2* du squelette diacylglycérol.

L'AP synthétisé dans les plastes, dit de structure procaryote, est formé par l'acylation successive du glycérol 3-phosphate par les protéines ATS1 et ATS2. Dans un premier temps le lyso-AP est formé par l'action de ATS1 (gène At1g32200). Cette enzyme, une glycérol-3-phosphate-acyl carrier protein acyltransférase, estérifie un acide gras provenant d'un acyl-ACP en position *sn-1* du glycérol-3-P. Cette enzyme a une préférence pour le 18:1-ACP (Yokoi et al., 1998). Cette enzyme est soluble, cependant elle n'est active qu'au contact de l'enveloppe des plastes (Joyard and Douce, 1977). Le lyso-AP ainsi formé est ensuite acylé en position *sn-2* par l'action de la 1-acylglycérol-3-phosphate acyl carrier protein acyltransférase ATS2 (gène At4g30580) générant de l'AP. ATS2, localisée dans l'enveloppe des plastes, présente une sélectivité envers 16:0-ACP. Cette enzyme a été identifié par analyse protéomique de l'enveloppe du chloroplaste chez *Arabidopsis thaliana* et chez l'épinard (Ferro et al., 2003; Ferro et al., 2002).

L'AP produit dans le RE est néosynthetisé par acylation du G3P à partir d'acyl-CoA. Ces acylations peuvent se faire dans le réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries (Frentzen et al., 1990). Les glycerol-3-phosphate acyltransférase du réticulum ne semblent pas avoir de spécificité concernant l'acide gras en position *sn-1* du glycérol. La 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase a, quant à elle, une spécificité importante concernant le C18-CoA, elle génère donc uniquement de l'AP ayant un acide gras à 18 atomes de carbone en position *sn-2* du glycérol, expliquant la différence de structure remarquable qui existe entre les lipides générés dans les plastes et ceux synthétisés dans le RE. A ce jour 9 glycerol-3-phosphate acyltransférases membranaires ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana* (GPAT1-9), GPAT1, 4, 5, 6, 7, 8 présentent une stéréospécificité en sn-2 et utilisent préférentiellement l'acide dicarboxylique-CoA ou les omega-OH-CoA indiquant qu'elles sont impliquées dans la synthèse des lipides extracellulaire, cutine et/ou subérine (Beisson et al., 2007; Li et al., 2007; Suh et al., 2005; Yang et al., 2012b). GPAT9 a récemment été caractérisée et montrée comme étant impliqué dans la synthèse des TAG et des lipides membranaire (Singer et al., 2016). L'AP néosynthétisé est utilisé pour la production des glycérolipides de forme eucaryote et en premier lieu les phospholipides.

Ces phospholipides peuvent être reconvertis en AP par les phospholipases D (PLD) (Hong et al., 2010), ou en DAG par les phospholipases C (NPC), l'AP et le DAG dérivés des phospholipides peuvent ensuite être utilisés, entre autre, pour la synthèse des glycolipides de structure eucaryote (voir partie sur la synthèse des galactolipides).

c. Synthèse du CDP-DAG

L'AP est converti en CDP-DAG par l'action d'une CTP phosphatidate cytidylyltransférase. Cette activité est la première étape de la synthèse de certains phospholipides tels que le PG, le DPG, le PI et la PS (Figure 6). La CTP phosphatidate cytidylyltransférase catalyse la réaction entre une molécule d'AP et une molécule de CTP pour former du CDP-DAG et du pyrophosphate. Chez les plantes, cette enzyme a été localisée dans plusieurs systèmes membranaires: les plastes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Dans la membrane interne de l'enveloppe des plastes, une CTP phosphatidate cytidylyltransférase est impliquée dans la synthèse du PG plastidial (Andrews and Mudd, 1985). Dans la membrane interne des mitochondries, une CTP phosphatidate cytidylyltransférase approvisionne la PG phosphate synthétase et la DPG synthétase pour la synthèse du DPG (Frentzen and Griebau, 1994). Enfin, la majorité de l'activité CTP phosphatidate cytidylyltransférase est détectée dans le réticulum. Une seule enzyme a été identifiée génétiquement chez *Arabidopsis thaliana*, AtCDS1 (locus At1g62430). Exprimée *in vitro*, elle présente une activité CTP phosphatidate cytidylyltransférase (Kopka et al., 1997). D'après une analyse *in silico*, cette enzyme est localisée dans le réticulum (Beisson et al., 2003) où elle pourrait nourrir la synthèse du PI, de la PS et d'une partie du PG.

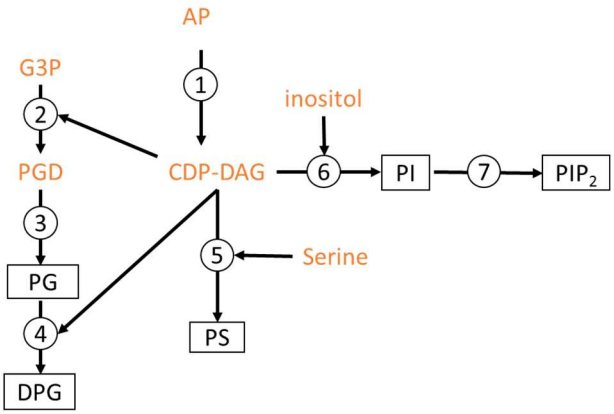


Figure 6 : Voies de synthèse des lipides issus du CDP-DAG. G3P. *Les flèches représentent les flux de lipides ou des têtes polaires, les ronds représentent les réactions enzymatiques, les rectangles les lipides finaux, en orange sont représenté les métabolites intermédiaires. Abréviation: AP: Acide phosphatidique, G3P: glycérol 3 phosphate. PG: phosphatidylglycérol. DPG : diphosphatidylglycérol/cardiolipine, PI: phosphoinositol, PIP2: phosphoinositdes.PS: Phosphatidylsérine. Enzymes représentées: 1) Phosphatidate citidylyltransferase 2) PG phosphate synthétase 3) PG phosphate phosphatase 4) DPG synthétase 5) PS synthétase 6) PI synthétase 7) PI kinase.*

d. Synthèse du DAG

L'AP est converti en DAG par les PAP (phosphatidic acid phosphatase) ou PAH (phosphatidic acid hydrolase). Le DAG est à l'origine de la synthèse des phopholipides tels que la PC, la PE, et des glycolipides. Chez les plantes, une activité PAP a été détectée au niveau du RE et dans le cytosol des cellules de ricin et de *Vigna radiata* (T S Moore, 1982). Une activité PAP a aussi été décrite au niveau de la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes de feuilles d'épinard, cette activité possède un pH optimum alcalin, et est inhibée par le Mg^{2+} (Block et al., 1983; Joyard and Douce, 1979). Par ailleurs, elle a été décrite comme étant retro inhibé par le DAG (Malherbe et al., 1992).

Chez *Arabidopsis thaliana*, il y a deux types d'enzymes ayant une activité PAP, les LPP et les PAH. Les LPP sont décrites comme appartenant à deux familles, eucaryote ou procaryote en fonction de leur homologie avec les PAP de mammifères ou les PAP de la cyanobactérie *Synechocystis Sp.*. Cinq isoformes de PAP procaryotes ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana* : LPPβ, LPPδ, LPPε1, LPPε2, LPPγ (Nakamura et al., 2007). LPPε1, LPPε2, LPPγ ont été localisées au niveau du chloroplaste et leurs caractéristiques de fonctionnement correspondent à celles de l'activité PAP mesurée à partir d'enveloppe de chloroplaste. Le rôle physiologique des LPPε1, LPPε2 et LPPγ a été étudié sur des mutants d'insertions. Le mutant lppγ n'est pas viable alors que la surexpression de la protéine LPPγ ne présente pas de phénotype lipidique, ce qui suggère d'une part son rôle essentiel mais aussi une régulation forte au niveau de l'enzyme. Par ailleurs le double mutant *lppε1xlppε2* ne présente lui non plus pas de phénotype lipidique ce qui indique une redondance fonctionnelle avec l'une ou l'autre des PAP chloroplastiques (Nakamura et al., 2007).

Les PAP eucaryotes sont représentées par les protéines LPP1, LPP2, LPP3 et LPP4 (Katagiri et al., 2005) (Nicotiana bentamiana)(van Schooten et al., 2006). LPP1 et LPP2 sont capables de déphosphoryler non seulement l'AP, mais aussi le diacylglycérol pyrophosphate (DGPP), un lipide très minoritaire formé par phosphorylation de l'AP (Brindley and Waggoner, 1998). LPP1 a une meilleure affinité pour le DGPP que pour l'AP alors que LPP2 déphosphoryle indifféremment les deux lipides (Pierrugues et al., 2001). L'expression et l'activité de LPP3 n'ont pas été rapportées à ce jour. Ces enzymes auraient donc *a priori*

un rôle mineur dans la synthèse des glycérolipides mais interviendraient plutôt dans les réponses aux stress (Pierrugues et al., 2001).

Deux PAP nommées PAH1 et PAH2 (locus At3g099560 et At5g42870) ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana* par homologie avec les PAP de la levure *Sacharomyces cerevisiae* (Carman and Henry, 2007; Han et al., 2006) (Nakamura et al., 2007). Chez la levure, PAH1 joue un rôle important dans la régulation de la synthèse des glycérolipides. Elle permet d'une part d'éliminer l'AP, dont l'accumulation active l'expression des gènes de synthèse des phospholipides, et d'autre part de synthétiser le DAG qui alimente la synthèse des lipides. Chez *Arabidopsis thaliana*, PAH1 et PAH2 ont également un rôle clé dans la synthèse des phospholipides.

Le DAG est à l'origine de la néosynthèse des principaux lipides membranaires des plantes : PC, PE, MGDG et DGDG. Dans les chapitres suivants, nous détaillerons d'abord la synthèse des phospholipides PC et PC, puis celle des galactolipides qui est fortement dépendante de la synthèse de ces phospholipides.

2. Synthèse des phospholipides

La synthèse des phospholipides peut se faire à partir du DAG ou du CDP-DAG par addition d'une tête polaire sur le lipide. A l'origine de la voie de synthèse des têtes polaires de la PS, PE et PC on trouve la sérine qui peut être greffée directement sur un CDP-DAG dans le cas de la PS ou être greffée sur le DAG après sa conversion et son activation en CDP-Ethanolamine ou CDP-Choline (Figure 7).

a. Synthèse de la phosphatidylcholine

La PC est néo synthétisée séquentiellement en cinq étapes. La choline est synthétisée *de novo* à partir de l'acide aminé sérine, qui est décarboxylé en éthanolamine par la sérine décarboxylase (Rontein et al., 2001). L'éthanolamine ainsi formée est ensuite phosphorylée par une choline éthanolamine kinase CEK, kinase donnant naissance à la P-éthanolamine, pouvant alternativement servir à la formation de PE (Lin et al., 2015; Tasseva et al., 2004). La synthèse de la PC se fait par méthylation successives de la P-éthanolamine médiée par les S-adenosyl N-méthyltransferase, PEAMT1, PEAMT2 et PMEAMT. PEAMT1 est capable d'effectuer les trois méthylations alors que PMEAMT n'est capable que des deux dernières méthylations formant de la P-choline (Bolognese and McGraw, 2000; Liu et al., 2015). La P-Choline est ensuite activée en CDP–choline par l'action d'une des deux phosphorylaminoalcool citidyltransferase (Inatsugi et al., 2009; Inatsugi et al., 2002). Enfin cette CDP-choline est transférée sur un DAG néosynthétisé par action des CDP:aminoalcool:DAGphosphosaminoalcool transferase (AAPT). Bien que cette voie de synthèse soit la voie principale de synthèse de la PC, il semblerait qu'il existe des voies alternatives de synthèse, faisant intervenir les mêmes enzymes d'activation et de transfert sur le DAG, mais agissant sur des formes partiellement méthylés de la PE. Les lipides résultant de ces voies alternatives serait ensuite méthylés séquentiellement par des Phosphatidyléthanolamine methyl transférases, Phosphatidyléthanolamine méthyltransférase et enfin Phosphatidyldiméthanolamine méthyltransferase. Une phospholipide méthyl transfèrase membranaire localisée dans le réticulum a été caractérisée chez *Arabidopsis thaliana* et le Soja (Figure 7) (Keogh et al., 2009).

De plus, il est à noter qu'il existe un échange extrêmement dynamique entre le pool d'acyl-CoA et la PC se traduisant par 1) l'incorporation prépondérante des acyl-CoA dans la PC avant leur incorporation dans l'AP, 2) un fort renouvellement des acides gras de la PC, 3) une formation de lyso-PC et d'acides gras libres à partir de la PC (Bates et al., 2007; Mongrand et al., 2000; Williams et al., 2000). Ces mécanismes mettent en jeu des enzymes telles que des acyltransférases, des phospholipases A, des

acylhydrolases et des acyl-CoA synthétases et constituent actuellement un important champ d'investigation pour revue voir (Bates, 2016; Li-Beisson et al., 2013).

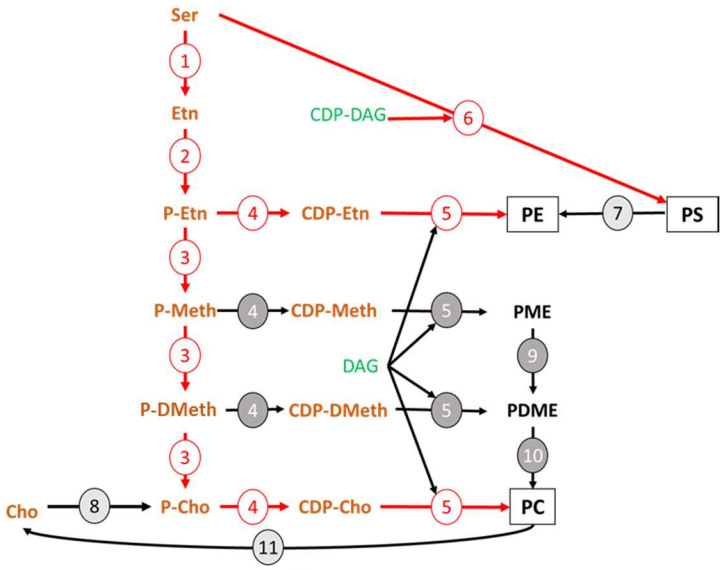


Figure 7 : Voies de synthèse de la phosphatidylcholine. *D'après (Kinney et al.,1993). Les flèches rouges indiquent les voies principales, en noir les voies alternatives, en gris les enzymes où les activités associées sont putatives ou non caractérisées, en brun les intermédiaires métaboliques des têtes polaires, en vert les precurseurs lipidiques, les rectangles noirs sont les phospholipides formés. Ser:Sérine, Cho: Choline, P-Chol: choline phosphate, CDP-Chol: cytidine diphosphate-choline, CDP-Eth: cytidine diphosphate-éthanolamine, CDP-Meth: cytidine diphosphate-méthyléthanolamine, CDP-DMeth: cytidine diphosphate-diméthyléthanolamine, P-Eth: éthanolamine phosphate, PME: méthyléthanolamine phosphate, PDME: phosphatidyldiméthyléthanolamine.1)Serine décarboxylase,2)Choline/Ethanolamine Kinase,3) S-adenosyl-L methionine N-methyl transferase, 4) Phosphorylaminoalcoolcytidyl transferase 5) CDP-aminoalcool:DAG phosphoaminoalcool transferase 6) PS synthétase, 7) Phosphatydilserine decarboxylase, 8) aminoalcool kinase, 9) Phosphatidylmethanolamine methyl transferase, 10) Phosphatidyldimethanolamine methyltransferase, 11) Phospholipase D.*

b. Synthèse de la phosphatidyléthanolamine

La synthèse de la PE partage certaines enzymes avec celle de la PC, notamment pour la conversion de la sérine en éthanolamine d'une part, et pour l'activation de l'éthanolamine en CDP-éthanolamine qui se fait par l'action de la Phosphorylaminoalcoolcytidyl transferase pouvant aussi convertir la choline en CDP-choline (Figure 7). Par ailleurs, il existe une voie alternative extrêmement mineure permettant de produire de la PE qui se fait par décarboxylation de la PS par la Phosphatidylsérine décarboxylase. Si la synthèse des têtes polaires de la PE partage une partie des enzymes et des substrats avec la voie de synthèse de la PC, il apparait cependant que le DAG utilisé provient de pools différents. En effet la désaturation des acides gras se fait principalement sur la PC or la PE présente elle aussi des insaturations, il est donc probable que le DAG utilisé pour produire la PE soit au moins en partie issue du recyclage de la PC.

3. Synthèse des galactolipides

Le DAG est le précurseur à la base de la synthèse des glycoglycérolipides, SQDG, MGDG et DGDG. Les enzymes qui synthétisent ces différents glycoglycérolipides à partir du DAG sont présentes au niveau de l'enveloppe des plastes. Chez *Arabidopsis thaliana*, elles utilisent soit du DAG de structure procaryote synthétisé dans l'enveloppe, soit du DAG eucaryote d'origine extraplastidiale. Les enzymes qui synthétisent les différents glycoglycérolipides sont relativement bien identifiées, par contre les

mécanismes aboutissant à la présence de DAG eucaryote au niveau de l'enveloppe des plastes et aux transferts de galactolipides et du SQDG de leur site de synthèse vers les autres membranes du plaste où ils sont également présents sont mal connus.

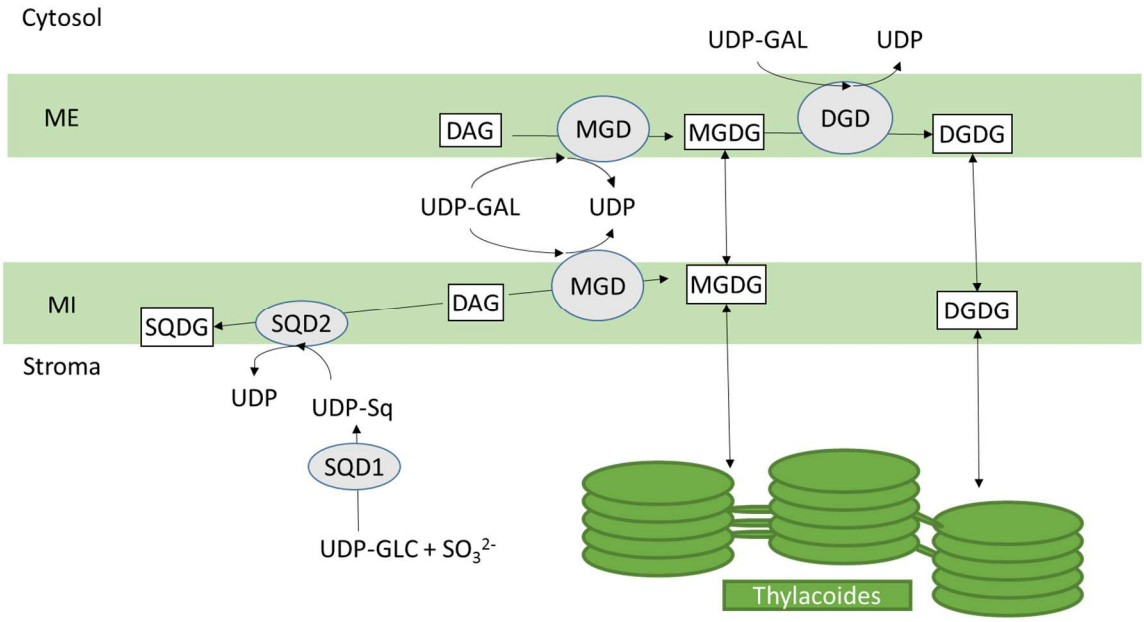


Figure 8 : Synthèse des glycolipides dans le chloroplaste. *Les enzymes sont en gris, les cadres blancs représentent les lipides. Le SQDG est un lipide minoritaire produit et restreint aux membranes plastidiales. Nous ne développerons pas sa synthèse dans cette synthèse bibliographique. Abréviation: ME: Membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste, MI: Membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste, SQDG: sulfoquinovosyl diacylglycérol, DAG: diacylglycérol, MGD: Monogalactosyldiacylglycérol synthétase, MGDG: Monogalactosyldiacylglycérol, DGD: Digalactosyldiacylglycérol synthétase, DGDG digalactosyldiacylglycérol, GLC: Glucose, GAL: galactose.*

a. Synthèse du MGDG

La synthèse des galactolipides se fait par transfert d'un monomère de galactose sur un DAG, ce DAG peut être formé à partir de l'AP chloroplastique par la voie procaryote ou provenir de l'hydrolyse de la PC par la voie eucaryote (voir partie synthèse de l'AP), le transfert du squelette diacylglycérol de la PC depuis le RE vers le plaste est discuté dans la partie trafic lipidique de cette synthèse bibliographique. Quelle que soit l'origine du squelette DAG, la synthèse des galactolipides est la même. Chez *Arabidopsis thaliana* il existe trois enzymes ayant une activité MGDG synthétase, MGD1, MGD2 et MGD3. Ces enzymes catalysent la galactosylation du DAG en MGDG (Figure 8). Le rôle essentiel de l'activité MGDG synthétase a par ailleurs été confirmé par l'étude de l'inhibition chimique des MGD par la Galvestine-1 ciblant spécifiquement ces enzymes (Botte et al., 2011; Boudiere et al., 2012). En effet, la galvestine-1 agit comme un compétiteur du DAG pour les MGDG synthases, le traitement avec cette drogue provoque une inhibition dose dépendante de la croissance des racines ainsi que des tissus aériens accompagnée d'une chlorose des feuilles. Les chloroplastes sont réduits en taille, présentent moins de thylacoides et l'enveloppe interne présente des invaginations. La prolongation du traitement résulte en une mortalité allant d'un tiers à 100% de 100 à 200 µM de Galvestine-1 dans le milieu.

MGD1 est essentielle à la formation des galactolipides. Cette enzyme monotopique est localisée au niveau de la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes, elle est capable d'utiliser aussi bien du DAG d'origine procaryote qu'eucaryote. Il est proposé qu'elle ait une activité catalytique au niveau de l'espace intermembranaire, en cohérence avec l'apparente absence d'UDP-Gal au niveau du stroma qui a été révélé par RMN (Li et al., 2011; Marechal et al., 1995; Miege et al., 1999). Cependant, une

épimérase résidant dans le stroma qui permet la conversion d'UDP-GLC en UDP-GAL, a été montré comme nécessaire à la synthèse des galactolipides dans le riz. Chez *Arabidopsis thaliana* les plantes mutantes pour l'homologue (At2g39080) de cette épimerase sont également embryoléthales (Li, Wang et al. 2011). L'orientation de cette enzyme reste donc matière à débat.

Les plantes mutantes KO pour cette protéine présentent un défaut de synthèse de MGDG et de DGDG, donc de synthèse des thylacoides et par voie de fait une létalité au stade embryonnaire en absence de source extérieure de carbone (Kobayashi et al., 2007). Le mutant KO mgd1-2 présente des invaginations au niveau de l'enveloppe du chloroplaste, comme dans les plantes traitées avec la Galvestine-1, suggérant un blocage de la synthèse du MGDG ne pouvant donc plus être transporté depuis l'enveloppe vers les thylacoides (Botte et al., 2011; Kobayashi et al., 2007). Le mutant Knock down mgd1-1, quant à lui présente des défauts de développement des chloroplastes avec moins de chlorophylle, et moins de thylacoïdes (Jarvis et al., 2000).

MGD1 a été montré comme étant fortement activée par de faibles concentrations d'AP (Dubots et al., 2010). Par ailleurs, sa liaison à la membrane est accrue par l'AP et le PG, du fait des interactions électrostatiques. De façon surprenante, MGD1 présente une forte affinité pour son substrat le MGDG, qui la maintient attachée à la membrane, alors qu'elle est exclue des membranes contenant de fortes proportions de DGDG. Ces effets des différents lipides sur l'attachement de MGD1 ont été étudiés sur monocouches de Langmuir (Sarkis et al., 2014). L'effet antagoniste du MGDG et du DGDG sur la liaison à la membrane de MGD1 suggère une localisation des MGD en microdomaines, comme discuté dans (Bastien et al., 2016). L'utilisation de l'AFM (Atomic force microscopy) a permis de révéler que dans les membranes riches en MGDG, MGD1 forme des structures allongées et réticulées. Ce genre de structure a par ailleurs été montré pour d'autres protéines de synthèse des lipides comme la monoglucosyldiacylglycerol synthétase d'E.Coli qui forme des regroupements lipoprotéiques interagissant avec FtsZ, composant de la machinerie de division bactérienne (Matsumoto et al., 2015). Ce regroupement d'enzymes pourrait ainsi accroitre la vitesse de synthèse du MGDG et favoriser la synthèse des thylacoides.

Les mutants KO pour MGD2 et MGD3, ainsi que le double mutant mgd2xmgd3 ne présentent pas de fort phénotype lorsque cultivés en condition non stressante (Kobayashi,. et al 2009). Ces enzymes sont localisées au niveau de la membrane externe de l'enveloppe du plaste, ne sont exprimées qu'au niveau des plastes non chlorophylliens comme ceux trouvés dans les racines, ou dans les chloroplastes en carence en phosphate (Kobayashi et al., 2009). Les MGD2 et 3 sont probablement associées à la membrane externe de l'enveloppe (Awai et al., 2001). Comme MGD1, MGD2 et MGD3 peuvent galactosyler le DAG de type procaryote et eucaryote. Néanmoins MGD2 et MGD3 sont plus sélectives que MGD1 et ont une meilleure spécificité pour le DAG eucaryote C18:2/C18:2 que pour le DAG procaryote C18:1/C16:0 (Awai et al., 2001). De ce fait, MGD2 et MGD3 sont sans doute responsables de la prédominance du MGDG de structure eucaryote dans les tissus non verts et de la structure eucaryote du DGDG synthétisé en carence de phosphate (Awai et al., 2001).

b. Synthèse du DGDG

Le MGDG peut ensuite être converti en DGDG par les DGDG synthétases. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe deux enzymes de ce type: DGD1 et DGD2, la mutation des deux gènes correspondant (respectivement AT3g11670 et AT3G49500) résulte en une abolition totale de la synthèse de DGDG. Ces enzymes localisées dans l'enveloppe externe du plaste (Froehlich et al., 2001; Kelly et al., 2003), catalysent le transfert d'une unité galactose provenant de l'UDP-gal sur le galactose du MGDG (Figure

8). Cette activité a été pour la première fois décrite grâce à la caractérisation du mutant dgd1 qui présente une réduction drastique de la teneur en DGDG (Dormann et al., 1995). Ce mutant présente par ailleurs un fort retard de croissance. Le gène correspondant a été par la suite isolé et la protéine associée montrée comme étant responsable de la majeure partie de la synthèse de DGDG (Dormann et al., 1999). La présence de DGDG dans ce mutant a amené l'idée qu'il existait une autre DGD responsable de ce DGDG résiduel. Cette autre DGD nommée DGD2 a été trouvée par analogie de séquence avec DGD1 (Kelly et al., 2003; Klaus et al., 2002). Le mutant dgd2 ne semble affecté ni dans la croissance ni concernant sa teneur en DGDG. La protéine DGD1 diffère de DGD2 par la présence en N-terminal d'un domaine dont le rôle pourrait être l'ancrage à la membrane interne de l'enveloppe du plaste. Il a été observé que l'activité de DGD1 ne dépend pas d'une interaction directe avec MGD1 (Froehlich et al., 2001). Ceci suggère que la synthèse du DGDG nécessite un transport du MGDG produit par MGD1 de la membrane interne vers la membrane externe de l'enveloppe.

c. Désaturation des galactolipides

Les galactolipides portent des acides gras désaturés. Ces désaturations peuvent provenir d'une part du fait qu'une partie des squelettes DAG sont issus de la PC désaturée dans le RE par FAD2 et FAD3 (voir partie II.2 de cette synthèse bibiographique), et d'autre part être le fait de l'action des désaturases chloroplastiques. Au niveau du chloroplaste, les désaturations sont opérées par FAD6 pour la désaturation du 18:1 en 18:2 et par FAD7 et FAD8 pour la conversion du 18:2 en 18:3 (Okuley et al., 1994, Somerville et Browse 1991, Iba et al., 1993)(Iba et al., 1993; Okuley et al., 1994; Somerville and Browse, 1991). Ces désaturases ont vraisemblablement un fonctionnement similaire aux désaturases du réticulum endoplasmique FAD2 et FAD3 dont le mécanisme est détaillé dans la partie concernant la désaturation de la PC de cette synthèse bibliographique. Cependant il est à noter que le donneur d'électron nécessaire à FAD6, FAD7 et FAD8 pour fonctionner est la ferrédoxine (Schmidt and Heinz, 1993), alors qu'il s'agit du cytochrome b5 dans le cas de FAD2 et FAD3 (Shanklin and Cahoon, 1998).

En résumé, les phospholipides sont majoritairement de structure eucaryote et sont synthétisés principalement au niveau du réticulum. Les glycolipides (les galactolipides et le sulfolipide) sont synthétisés uniquement au niveau des plastes et présentent soit une structure procaryote soit une structure eucaryote car ils sont générés à partir des deux types de DAG. On distingue donc la voie de synthèse procaryote des glycolipides de la voie de synthèse eucaryote selon que l'origine du DAG est entièrement plastidiale ou met en jeu des compartiments extraplastidiaux. La PC joue un rôle centrale dans la voie eucaryote, notamment par la fait qu'elle est le site majeur de la désaturation et de l'acyl éditing, qu'elle est à l'origine du DAG eucaryote (Ohlrogge and Browse, 1995; Ohlrogge and Jaworski, 1997) et que la majorité des acides gras du pool d'acyl-CoA néosynthétisés sont d'abord incorporés sur la PC puis sont redistribués, après leurs désaturations, aux autres lipides (Bates et al., 2007). La délocalisation de la synthèse du squelette diacylglycérol des glycolipides souligne l'importance des transferts de lipides entre les différentes membranes notamment entre le RE et le chloroplaste. Le paragraphe suivant présente les différentes voies de transfert des lipides entre les différentes membranes et plus particulièrement le transfert de la PC et de son squelette DAG depuis le RE vers les plastes.

4. L'édition des acides gras

a. La désaturation de la phosphatidylcholine

Au niveau du RE, la désaturation des lipides se fait séquentiellement par l'action de FAD2 et de FAD3 qui désaturent les acides gras 18:1 en 18:2 et les 18:2 en 18:3 respectivement. Ces protéines

membranaires ont des homologues chez les animaux, les champignons et les bactéries. Elles génèrent des doubles liaisons en cis de l'acide gras, et requiert pour cela un réducteur, le cytochrome b_5, et de l'oxygène moléculaire (Bates, 2016; Bates et al., 2009; Sperling and Heinz, 1993).

Il a récemment été montré que les différentes désaturases forment des homodimères, mais aussi des hétérodimères. En effet, toutes les FAD ont été montrées pour interagir avec elles même, ainsi que FAD2 et FAD3 peuvent interagir entre elles, et potentiellement former une canalisation du flux de PC à partir du 18:1 vers le 18:3 sans libération de 18:2. De la même façon FAD6 peut interagir avec FAD7 et FAD8. La canalisation du flux de PC par l'interaction de FAD2 et FAD3 pourrait être responsable de 20% de la PC 18:3 (Lou et al., 2014). Cependant le rôle exact de ces homo/hétérodimérisations reste sujet à débat: en effet, pour fonctionner, les FAD ont besoin de deux électrons, ceux-ci proviennent du cytochrome b_5 lequel ne génère qu'un électron à la fois. Ainsi il se pourrait aussi que la fonction de ces interactions soit, non pas la canalisation du flux de PC, mais le transfert de l'électron capté par l'une des FAD vers son interactant pour lui donner l'électron supplémentaire dont elle a besoin pour effectuer la désaturation (Bates, 2016; Bates et al., 2009; Lou et al., 2014; Sperling and Heinz, 1993).

Le processus de désaturation multiple dans le RE se fait principalement sur la PC (Bates et al., 2009; Bates et al., 2007; Ohlrogge and Jaworski, 1997; Sperling and Heinz, 1993), et majoritairement sur l'acide gras en position *sn-2 (Sperling and Heinz, 1993)*, cependant les acides gras polyinsaturés sont retrouvés sur d'autres lipides aussi bien en position *sn-1* qu'en position *sn-2*. De plus, l'analyse du mutant fad3 fait apparaitre que malgré la disruption du processus de désaturation des lipides dans le RE, une partie des phospholipides présentent des acides gras 18:3. Ceux-ci ne peuvent donc avoir été désaturés que dans le chloroplaste. Ces données dans leur ensemble soulignent la nécessité de mécanismes de transfert des acides gras entre lipides et sur les différentes positions du glycérol.

Les analyses des flux d'acides gras, au moyen de marquage métabolique utilisant de l'acétate radioactif, ont permis de mettre en évidence le fait que la majorité des acides gras néosynthétisés sont en premier lieu incorporés sur la PC. Ces expériences d'abord effectuées sur le pois puis confirmées chez *Arabidopsis thaliana*, ont montré une incorporation très rapide de la radioactivité sur la PC puis son transfert vers les autres lipides (Allen et al., 2015; Bates et al., 2009; Bates et al., 2012; Wang and Benning, 2012). Ainsi il apparait que ce flux d'acides gras vers la PC, est un flux beaucoup plus important que celui consistant à intégrer les acides gras néosynthétisés sur l'AP, ce qui souligne la nécessité d'avoir des mécanismes d'échange d'acides gras entre la PC et les autres lipides membranaires ou les TAG. Bien que certains flux et mécanismes aient été décrits il y a 60ans, l'implication relative des différentes isoenzymes reste inconnues (Lands, 1965; P G Roughan and Slack, 1982; Stymne and Stobart, 1984). La somme des mécanismes permettant les échanges d'acide gras de la PC vers les autres lipides est regroupée sous le terme d'édition, cycle de Lands ou remodelage des acides gras.

b. L'édition des acides gras de la phosphatidylcholine

Le cycle de Lands, d'abord caractérisé chez le pois, est le mécanisme principal par lequel les acides gras néosynthétisés sont incorporés à la PC. La PC peut être convertie en Lyso-PC par l'action de phospholipase A_2 (PLA_2) lesquelles hydrolysent l'acide gras en position *sn-2* de la PC, l'acide gras libre ainsi produit est ensuite convertie en acyl-CoA par les LACS et intègre un pool d'acyl-CoA cytosolique. La lyso-PC peut ensuite être acylée à nouveau par une lyso-PC acyltransférase (LPCAT) avec un acyl CoA provenant directement de la néosynthèse des acides gras (Figure 9). De cette façon le pool d'acyl-

CoA est enrichi en acides gras désaturés provenant de la PC, cela est démontré par le fait que le double mutant lpcat1 et lpcat2 présente un détournement du flux d'acide gras néosynthétisé vers le DAG et non plus vers la PC (Bates et al., 2012; Wang and Benning, 2012). De plus certaines isoenzymes DGAT qui synthétisent les TAG ont une spécificité envers les acides gras poly-insaturés comme par exemple DGAT2 dont les mutants présentent des modifications concernant le profil d'acides gras des TAG. Il se pourrait que les PLA_2 puissent ne pas être essentiels dans ce cycle, attendu qu'il a été décrit que les LPCAT pourraient catalyser la réaction dans les deux sens c'est-à-dire former de la PC à partir d'une lyso-PC et d'un acyl-CoA. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe 29 phospholipase A possiblement impliquées dans le cycle de Lands, parmi lesquelles certaines sont régulées transcriptionellement dans le double mutant lpcat1 et lpcat2 (Bates, 2016).

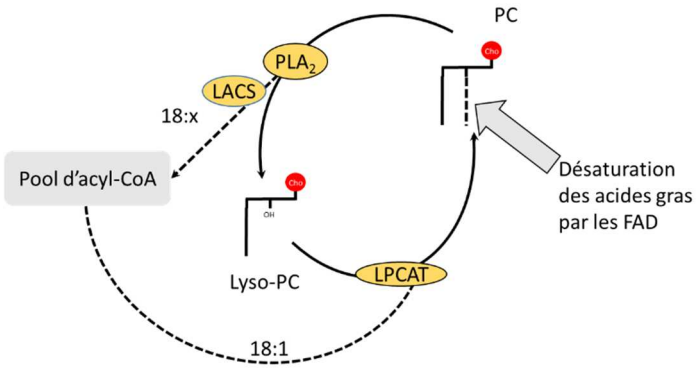


***Figure 9 : Schématisation du cycle de Lands**. Les flèches pleines représentent le trajet du squelette DAG, les flèches en pointillés, les acides gras/Acyl-CoA. L'acide gras en pointillé représente celui qui est édité. Abréviations: PC: phosphatidylcholine, lyso-PC: Lysophosphatidylcholine,PLA_2: Phospholipase A2, LACS: Long chain acyl-CoA synthetase, LPCAT: Lysophosphophatidylcholine acyltransférase. Issue de (Bates, 2016).*

Dans les mécanismes d'édition des acides gras on trouve aussi les phospholipides: DAG acyltranférases (PDAT), dont la fonction est de transférer un acide gras de la position *sn-2* d'une PC vers la position *sn-3* d'un DAG. Ces enzymes génèrent donc du TAG et de la lyso-PC à partir de la PC et du DAG. Permettant ainsi l'incorporation d'acides gras désaturés de la PC sur les TAG et permettant le recyclage de la PC en lyso-PC (Figure 10) (Dahlqvist et al., 2000). L'expression des différentes isoenzymes PDAT et DGAT présentent des spécificités mais aussi une certaine redondance, leurs implications respectives au sein d'un même tissu n'ont pas à ce jour été caractérisées (Li et al., 2010).

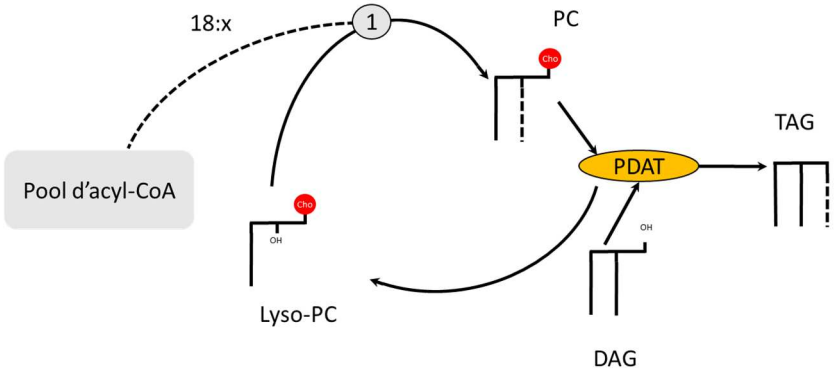


***Figure 10 : Edition des acides gras entre PC et TAG par les PDAT.** Cette réaction est requise pour canaliser le flux d'acide gras désaturé sur la PC vers la position sn-3 du squelette glycérol des TAG. Les lignes pleines représentent le flux du squelette diacylglycérol, les lignes pointillées les flux des acyls, l'acide gras en pointillé représente l'acide gras désaturé provenant du pool d'acyl-COA ou désaturé par les FAD. La réaction enzymatique 1) est la LPCAT (précédemment décrite). Abréviations: PC:*

phosphatidylcholine, lyso-PC: Lysophosphatidylcholine, DAG: diacylglycérol, TAG: triacylglycérol, PDAT: phospholipid:diacylglycérol acyltransférase. Issue de (Bates, 2016).

Les mécanismes d'éditions des acides gras précédemment décrits ne concernent que les acides gras en position *sn-2* de la PC. Or il a été montré qu'une partie du flux d'acide gras passe par la position *sn-1* (Bates et al., 2009; Bates et al., 2007). L'implication des PLA_1 (hydrolysant l'acide gras en position *sn-1* de la PC) ou celles des activités équivalentes aux LPCAT et PDAT pour la position *sn-1* n'ont pas été caractérisées. Récemment, l'activité d'une lyso-PC transacylase (LPCT) été décrite et permet, avec l'action d'une glycérophosphocholine acyltransférase (GPCAT), de décrire une partie des mécanismes impliqués dans l'édition de l'acide gras en position *sn-1*. En effet, l'activité LPCT, qui produit de la PC et de la glycérophosphocholine à partir de deux lyso-PC a été décrite dans des protéoliposomes reconstitués de levure et d'*Arabidopsis thaliana* (Lager et al., 2015; Stalberg et al., 2008) (Figure 11.A). La glycérophosphocholine peut ensuite être acylée en position *sn-1* par une GPCAT générant de la lyso-PC permettant ainsi l'incorporation en position *sn-1* d'un acyl-CoA désaturé (Lager et al., 2015) (Figure11B).

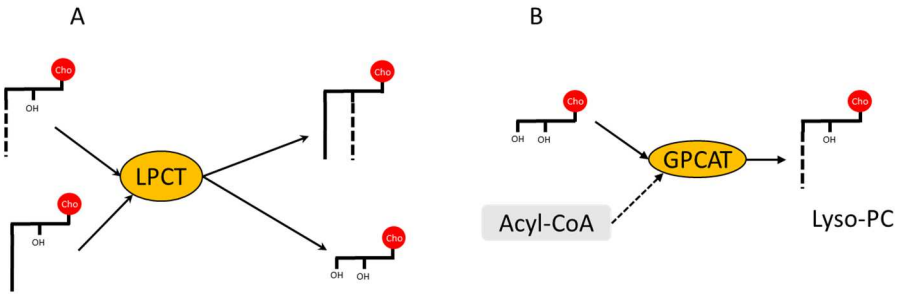


Figure 11 : Mécanisme d'édition des acides gras en position sn-1 de la PC par LPCT et GPCAT. *Les lignes pleines représentent le flux du squelette diacylglycérol, les lignes en pointillé les flux des acyls, l'acide gras en pointillé représente l'acide gras désaturé par les FAD. Abreviations: PC: phosphatidylcholine, lyso-PC: Lysophosphatidylcholine, LPCT: Lysophosphatidylcholinetransacylase, GPCAT: Glycérophophocholine acyl transférase. Issue de (Bates, 2016).*

Ces mécanismes d'édition des acides gras de la PC (résumés Figure 12) sont un facteur déterminant dans le maintien de l'homéostasie lipidique, notamment par le fait que la majorité des galactolipides TAG et phospholipides présentent un squelette DAG issu de cette édition des acides gras de la PC.

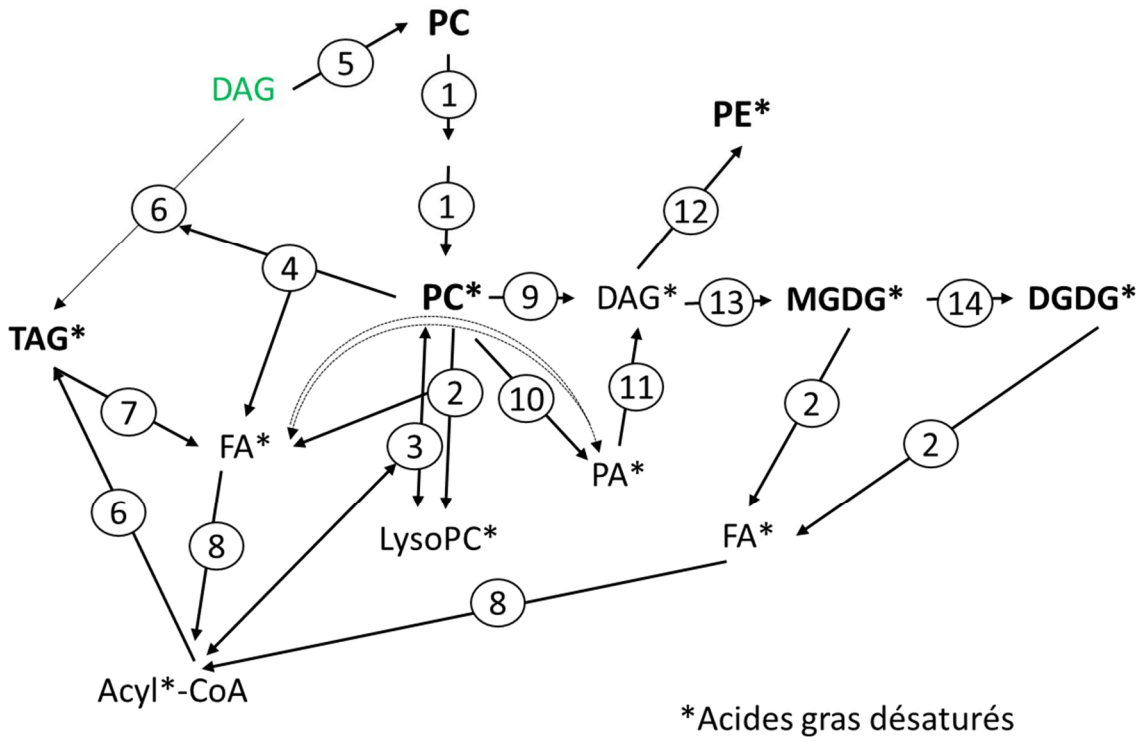


Figure 12 : La PC, un hub métabolique au centre de la synthèse des glycérolipides*. La PC se trouve au centre du métabolisme des glycérolipides, par son rôle prépondérant dans la désaturation des acides gras. Les flèches représentent les différents flux de lipides ou acides gras les cercles sont les enzymes impliquées. 1. Fatty acid desaturase, 2. Phospholipases A_2, 3. Lysophophatidylcholine acyltransférases, 4. Phosphatidylcholine diacylglycerol acyltranférase 5. Phospholipide AdoMet methyltransferase 7. Triacylglycerol lipase 8. Long chain acyl-CoA synthétase 9. Phospholipase C 10. Phospholipase D, 11. Phosphatidic acid phospatase, 13. MGDG synthétase, 14.DGDG synthétase. Les données bibliographiques correspondantes sont données dans le texte.*

III. Le trafic lipidique pour approvisionner la synthèse des galactolipides

Comme nous l'avons vu, la synthèse des lipides et particulièrement celle des galactolipides nécessite un transport de lipides entre les différents compartiments membranaires. Cependant, la nature hydrophobe des lipides fait que les vitesses de transferts intermembranaires spontanés ne sont pas cohérentes avec celles observées in vivo (Figure 13). Dans le paragraphe suivant, nous allons détailler dans un premier temps les mécanismes permettant les transferts intermembranaires de lipides en nous intéressant plus particulièrement aux transferts non vésiculaires. Dans un deuxième temps nous nous attacherons aux transferts intramembranaires: les mécanismes permettant le passage des lipides d'un feuillet à l'autre de la même membrane.

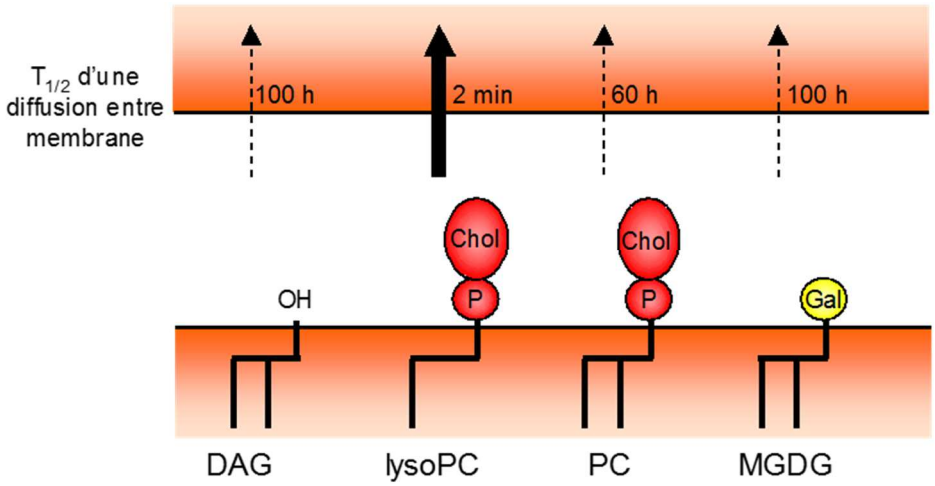


Figure 13 : Les temps de demi-vie des mouvements spontanés des lipides d'après (Holthuis and Levine, 2005)*. La flèche large indique les mouvements rapides alors que les flèches en pointillé indiquent les mouvements lents. P : phosphate, Chol : choline, Gal : galactose.*

1. Les transferts intermembranaires

Les transferts intermembranaires de lipides sont essentiels pour maintenir l'homéostasie lipidique des différentes membranes. Ces transferts peuvent être regroupés en deux catégories, les transferts vésiculaires et les transferts par contact intermembranaire.

a. Le trafic vésiculaire

Le RE est le siège de la synthèse des phospholipides, sphingolipides, stérols et de la majorité des protéines. Cet organite, connecté avec les autres compartiments, est considéré comme un point central du métabolisme des cellules. Que ce soit avec ou sans l'aide du Golgi, le RE fournit protéines et lipides aux membranes vacuolaire et plasmique par l'intermédiaire de vésicules se déplaçant le long des filaments d'actine (Hawes and Satiat-Jeunemaitre, 2005). Le mécanisme général du trafic vésiculaire se fait en plusieurs étapes pour revue (Jurgens, 2004; Nebenfuhr, 2002). En résumé, le recrutement des complexes protéiques au niveau de la membrane donneuse se fait par de petites protéines Ras GTPase couplées à des facteurs d'échange de GTP. Ces complexes peuvent contenir des flippases et des protéines contenant des domaines Bar permettant de créer et de maintenir la courbure des membranes de façon à générer les vésicules (Devaux et al., 2008; Frost et al., 2009). Des protéines formant un manteau autour des vésicules naissantes comme les adaptines et les clathrines peuvent aussi participer à ces complexes. La fission membranaire entre la vésicule et la membrane donneuse se fait à l'aide des dynamines, recrutées et/ou régulées par les domaines Bar, avec l'aide du cytosquelette d'actine (Itoh and De Camilli, 2006; Takenawa and Suetsugu, 2007). Le cytosquelette d'actine, avec les myosines permet le déplacement des vésicules vers la membrane cible. L'ancrage et la fusion au niveau de la membrane receveuse se fait par l'intermédiaire des SNARE (Soluble N-ethylmeimide factor Attachement protein REceptor) et de petites GTPases. Cependant si ce mécanisme a largement été décrit pour le transport des protéines, son rôle dans le trafic lipidique est en grande partie mal connu. Le trafic vésiculaire concernant les endomembranes est exposé (Figure 14).

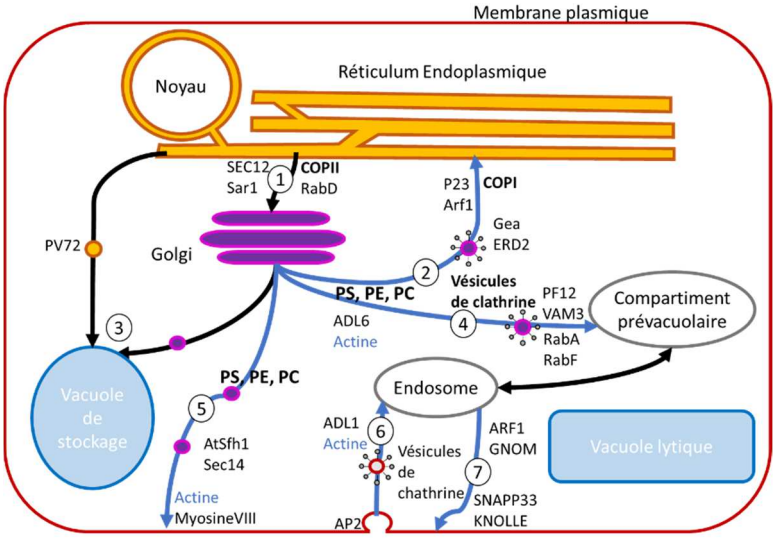


Figure 14 : Schéma simplifié de la voie sécrétrice des plantes d'après (Hawes and Satiat-Jeunemaitre, 2005; Mousley et al., 2007). *Ce schéma montre les différentes voies à partir du réticulum endoplasmique et les différentes protéines impliquées dans le trafic vésiculaire. 1- Le transfert antérograde du réticulum vers le Golgi fait intervenir une machinerie vésiculaire de type COPII. Les protéines identifiées dans ce transfert sont la GTPase Sar1, le facteur échangeur de GTP Sec12, les complexes Sec13 et Sec23 du manteau, et la GTPase RabD. 2- Le transfert rétrograde du Golgi vers le réticulum fait intervenir une machinerie vésiculaire de type COPI. Les protéines identifiées dans ce transfert sont la GTPase Arf1, en interaction avec une protéine transmembranaire p23, le facteur échangeur de GTP Gea, le récepteur du motif H/KDEL responsable du trafic protéique rétrograde ERD2. Ce transfert est dépendant de l'actine. 3- Le transfert du réticulum et du Golgi vers la vacuole de stockage par le biais de vésicules denses n'est pas caractérisé. La seule protéine identifiée dans ce transfert est le récepteur d'adressage à la vacuole de stockage PV72. 4- Le transfert du Golgi vers la vacuole lytique en passant par le compartiment prévacuolaire fait intervenir une machinerie vésiculaire de type clathrine. Les protéines identifiées dans la formation des vésicules sont la GTPase Arf1, le récepteur du motif d'adressage à la vacuole BP80 capable de recruter le complexe adaptateur AP1 et la clathrine. La fusion au compartiment prévacuolaire implique les v-SNARE PEP12 et VAM3, les t-SNARE SYP25 et VTI11, et les GTPases RabA et RabF. Ce transfert est dépendant de l'actine et de la dynamine ADL6. 5- Le transfert du Golgi vers la membrane plasmique n'est pas identifié. Aucune protéine intervenant dans la formation et la fusion des vésicules n'a été trouvée. Seules Sec14 et Sfh1, ont été caractérisées. Certaines protéines Sec14p-like ont été montrées pour être des protéines transférant in vitro le PI entre membrane et étant impliqué dans la voie sécrétrice notamment entre Golgi et membrane plasmique (Mousley et al., 2007). Ce transfert est dépendant de l'actine. 6- L'endocytose fait intervenir une machinerie vésiculaire de type clathrine. Les protéines identifiées dans la formation des vésicules sont le complexe adaptateur AP2 et la clathrine. Ce transfert est dépendant de l'actine et de la dynamine ADL1. 7- L'exocytose fait intervenir une machinerie vésiculaire non caractérisée. Les protéines identifiées dans la formation des vésicules sont la GTPase Arf1 et le facteur échangeur de GTP GNOM. La fusion à la membrane plasmique implique la t-SNARE KNOLLE et la v-SNARE SNAP33.*

Le trafic vésiculaire de la voie sécrétrice a été très peu étudié du point de vue du trafic des glycérolipides. Pour résumer, le trafic réticulum-Golgi ne possède pas de spécificité pour les glycérolipides, la spécificité du trafic vers les vacuoles est inconnue ; alors que dans le trafic vers la membrane plasmique, la PS est exclusivement transférée par les vésicules alors que la PE et la PC ne le sont qu'en partie et que le PI n'est pas transféré par ces vésicules (Jurgens, 2004).

Par ailleurs, au sein des chloroplastes, les lipides formant les thylacoïdes sont synthétisés au niveau de l'enveloppe des plastes. Un transfert lipidique entre ces deux compartiments est donc nécessaire. L'observation en microscopie électronique de vésicules en formation au niveau de la membrane interne de l'enveloppe sur des plantes cultivées à 10°C pourrait indiquer un trafic vésiculaire (Morre et al., 1991). De plus il a été montré par analyse bio-informatique, l'existence d'une machinerie similaire à COPII au niveau des plastes, ce qui semblerait indiquer la présence d'une voie vésiculaire entre ces systèmes membranaires (Andersson and Sandelius, 2004). De plus, une protéine induisant la formation de vésicules, nommée VIPP1 a été montrée pour être essentielle à la maintenance des

thylacoides (Kroll et al., 2001). Cependant, bien que les plantes KO pour cette protéine aient un phénotype embryoléthal, avec un défaut de formation des thylacoïdes, des études récentes ont montré qu'elle n'était impliquée que dans la protection des thylacoïdes et de la membrane interne de l'enveloppe mais pas dans la formation des thylacoïdes (Zhang and Sakamoto, 2013). L'observation de connections entre l'enveloppe et les thylacoïdes a été observée lors de traitement des plantes à la Galvestine-1, un inhibiteur de MGD (Botte et al., 2011; Boudiere et al., 2012). Cependant les observations de vésicules ou de connexions reliant l'enveloppe et les thylacoïdes n'ont été faites que lorsque les plantes sont soumises à des conditions de stress et rarement dans des conditions normales de croissance. Une hypothèse alternative, au trafic vésiculaire entre ces membrane serait un transfert par une voie non vésiculaire, non lamellaire, se faisant par la formation de structure en hexagonal II comme discuté par (Bastien et al., 2016).

Ainsi, le trafic vésiculaire joue un rôle dans le trafic des glycérolipides au sein des membranes mais il ne permet pas de rendre compte de la spécificité de certains des transferts menant aux différences de compositions très marquées qui existent entre les différentes membranes. De plus, ce type de transfert ne fournit pas tous les lipides nécessaires à la membrane plasmique et il n'intervient pas dans le transfert des lipides vers les mitochondries et les plastes. Il existe donc un autre mode de transfert de lipides : le contact membranaire entre deux organites. Par opposition au transfert vésiculaire, le transfert par contact ne fait pas intervenir *a priori* de fusion membranaire.

b. Transfert par contact intermembranaire

Chaque organite a une fonction spécialisée. Pour mener à bien ces fonctions, chaque organite est positionné de façon coordonnée avec les autres. Ces mouvements sont généralement liés au cytosquelette d'actine et amènent les différents organites à avoir des contacts les uns avec les autres. Les sites de contacts intermembranaires (MCS pour membrane contact site), permettent la communication et l'échange de lipides entre les différentes membranes. Les MCS sont définis par une zone de contact (distance entre les membranes inférieure à 30 nm), l'absence de fusion entre les deux membranes (bien que des hémifusions transitoires puissent apparaitre), l'enrichissement en protéines ou lipides spécifiques et par le fait qu'au moins un des deux organites est affecté au niveau de sa fonction ou de sa composition (Prinz, 2014).

1. Zones de contact intermembranaire : le réticulum endoplasmique, un organite central

Parmi les organites formant des MCS, le RE joue un rôle de premier plan. En effet, il forme un réseau réticulé extrêmement dynamique et est en contact avec les mitochondries, la membrane plasmique, les peroxysomes, la vacuole et, comme cela sera détaillé par la suite, les chloroplastes (Figure 15).

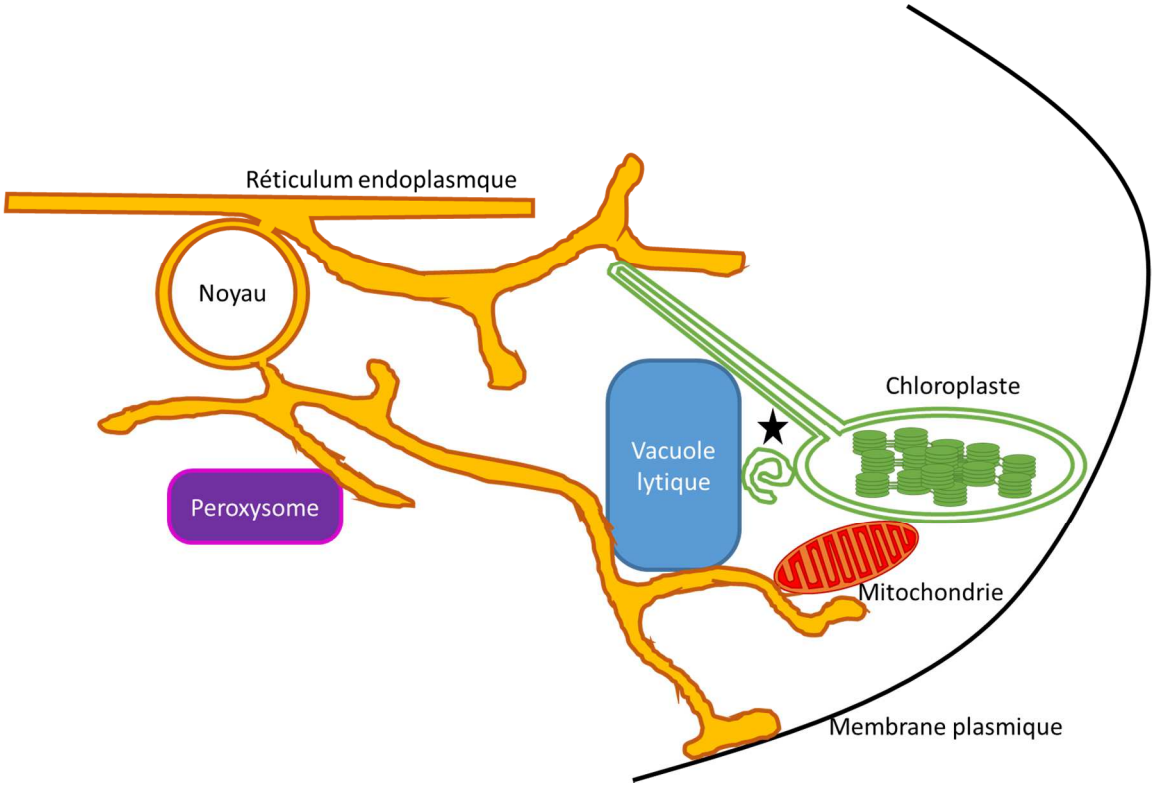


Figure 15 : Zones de contact connues dans la cellule végétale entre différents organites. *Le réticulum forme un réseau qui facilite le transfert de lipides entre les organites. Les chloroplastes créent des extensions de l'enveloppe sous forme de stromules ou de structures myéliniques, indiquées par une étoile (Hodge et al., 1955). La majorité des MCS implique des protéines de transfert de calcium ou des protéines de transfert de lipides (LTP pour lipid transfert protein) (Lev, 2010). Le calcium est une molécule signal qui peut être potentiellement toxique et dont les échanges doivent être très finement régulés, les lipides sont quant à eux des éléments essentiels de l'identité des organites. Les MCS les mieux caractérisés sont ceux qui concernent la mitochondrie et le RE chez la levure S. cerevisiae, aussi appelés MAM (mitochondrial associated membranes). Chez la levure, la PE est majoritairement synthétisée par décarboxylation de la PS au niveau des mitochondries alors que la PS est synthétisée au niveau du réticulum. Ces MAM ont été décrits comme étant enrichies en PS synthase (Rontein et al., 2003). Les contacts entre le RE et la mitochondrie sont maintenus par l'intermédiaire du complexe ERMES (ER-mitochondrial encounter structure) ou des protéines (Lang et al., 2015; Tan et al., 2013). Ces contacts favorisent le transfert de PS à la mitochondrie. La PS pourrait alors être transloquée au niveau de la membrane interne des mitochondries par le complexe MICOS qui permet les MCS entre membrane interne et externe des mitochondries (Kozvak-Pavlovic 2016)(Kozjak-Pavlovic, 2016). Une fois à la membrane interne, la PS est décarboxylée en PE et retourne au RE probablement par la même voie. Cette voie existe chez A. thaliana mais elle est très minoritaire pour la synthèse de PE (Michaud et al., 2016; Rontein et al., 2003). En effet la mutation des trois PS décarboxylases mitochondriales n'impacte que très faiblement la croissance ainsi que les teneurs en PS et PE (Nerlich et al., 2007). De plus les mitochondries de plantes ne sont capables de synthétiser qu'une faible proportion des lipides qui composent leur membranes, rendant nécessaire l'import de PC, PI, et PS, et peuvent importer du PG bien qu'il existe une voie de synthèse mitochondriale de ce dernier lipide (Michaud et al., 2016).*

Un autre type de MCS extensivement décrits sont ceux entre le RE et la membrane plasmique, nommés PAM (pour Plasma membrane Associated Membrane). Les PAM ont d'abord été découvertes en microscopie électronique dans les cellules musculaires de mammifère (Franzini-Armstrong, 1964). Ces PAM sont médiées par des protéines, les junctophilines (Takeshima et al., 2000), et ont été montrées comme étant impliquées dans la signalisation calcique à l'origine de la contraction musculaire (Murphy et al., 2013). Chez S. *cerevisiae*, les PAM ont été décrites comme représentant 40% de la surface de la membrane plasmique. La disruption de 6 protéines est suffisante pour éliminer les contacts entre la membrane plasmique et le RE (Chung et al., 2015). En plus de la signalisation calcique, les PAM ont été montrées comme étant d'une grande importance dans l'homéostasie lipidique de la membrane plasmique. En effet, bien que le trafic vésiculaire soit important entre ces membranes, les PAM sont impliquées dans l'import en stérols, en PS et en PIP2 à la membrane plasmique (Chung et al., 2015;

Mesmin and Antonny, 2016; Moser von Filseck et al., 2015). A part la visualisation en microscopie électronique des PAMs, aucune donnée fonctionnelle n'est actuellement connue chez *Arabidopsis thaliana*.

Chez les organismes photosynthétiques, notamment les plantes supérieures, un autre type de MCS a été décrit: les PlAM (pour Plastid Associated Membrane). Comme nous l'avons vu dans la partie sur la synthèse des lipides, les échanges entre chloroplaste et RE sont essentiels à la synthèse des phospholipides d'une part, du fait de la synthèse chloroplastique des acide gras, et à la synthèse des glycolipides d'autre part, du fait que la moitié de ceux-ci dérivent de la PC. Cependant aucune observation n'a permis de montrer l'existence d'un trafic vésiculaire entre ces organites. Or, le RE et les chloroplastes interagissent physiquement. En effet, par microscopie de fluorescence, il a été montré que des branches du RE entrent au contact du chloroplaste (Andersson et al., 2007a, b; Sparkes et al., 2009). Par ailleurs, les chloroplastes peuvent présenter des extensions de leur enveloppe nommées stromules (pour stroma filled tubules), qui ont été observées comme longeant les tubules du RE et se branchant à ceux-ci (Mitsuhashi et al., 2000; Schattat et al., 2011a; Schattat et al., 2011b). Par manipulation optique à l'aide de lasers, il a été démontré que ces interactions sont relativement fortes: de l'ordre de 400pN, ce qui est cohérent avec une adhérence médiée par des protéines, aujourd'hui inconnues. De plus, une lipase/acyl hydrolase de *Brassica napus,* localisée dans la membrane externe de l'enveloppe, exprimée en fusion à la GFP dans des cellules de tabac a une localisation discrète au niveau des zones de contact avec le RE (Tan et al., 2011). Ces données dans leur ensemble donnent du crédit à l'hypothèse selon laquelle les PlAM ont un rôle majeur dans le trafic lipidique entre le chloroplaste et le RE.

2. Protéines et mécanismes de transfert de lipide au niveau des MCS.

Les transferts de lipides au sein des MCS peuvent être le fait de cinq mécanismes différents: la diffusion simple, la collision entre membrane, l'hémifusion, les protéines de transfert et les tunnels protéiques (Figure 16). Concernant la diffusion simple, la vitesse à laquelle les lipides sont exclus puis réintégrés aux membranes n'est cohérente qu'avec certains lysolipides comme la lyso-PC. En effet, l'hydrophobicité des lipides rend très rare les évènements d'exclusion des lipides de leur membrane (Ferrell et al., 1985; Holthuis and Levine, 2005) (Figure 13 et 16A).

Les échanges par collisions peuvent se faire lorsque les membranes sont en contact direct, ce qui perturbe leur stabilité et pourrait permettre l'échange de lipides spontané (Lev, 2010; Prinz, 2010) (Figure 16B). Une apposition entre les membranes de ce type pourrait entrainer des hémifusions, facilitées par des fusions incomplètes dues ou non aux protéines SNAREs (Figure 16C). Ainsi les feuillets opposés des deux membranes pourraient former, au moins transitoirement, des structures où les échanges de lipides entre les membranes seraient possibles (Sasser and Fratti, 2014). Cependant, les expériences de mises en présence de membranes reconstituées (cellules dénuées de leur cytosol) menées par (Merklinger et al., 2016), indiquent que ces trois types d'échanges ne pourraient pas

participer à plus de 3% des échanges de lipides entre ces membranes du fait de leur rareté ou de leur vitesse respective.

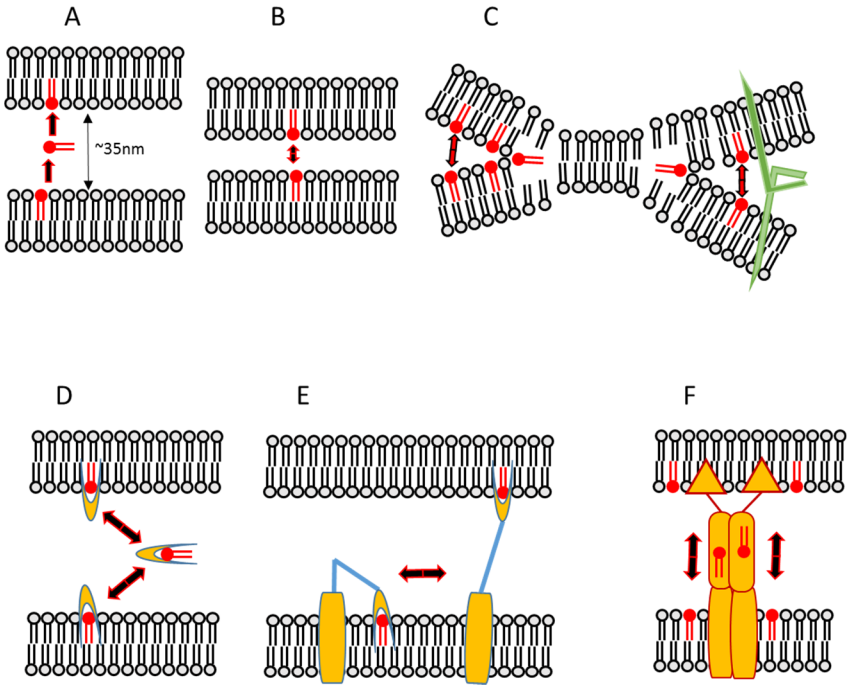


Figure 16 : Modèles mécanistiques pour le trafic non vésiculaire. *Les échanges de lipides (flèches rouges et noires) peuvent selon ces hypothèses se faire par voie passive (A, B, C gauche) ou facilitée (C droite, D, E, F). Le passage de la barrière énergétique que représente l'exposition au cytoplasme aqueux pourrait se faire sans intermédiaire protéique par diffusion, après éjection du lipide de la membrane donneuse et sa réinsertion dans la membrane réceptrice (A). La collision des membranes (B) peut permettre l'échange de lipides en minimisant l'exposition des lipides au cytoplasme. L'hémifusion (C) peut impliquer des collisions persistantes (gauche) ou être facilité par des protéines (en vert à droite) amenant à une fusion incomplète médié par les SNAREs (comme entre la R-SNARE du RE sec22p, et la Q-SNARE localisée à la membrane plasmique ref) provocant dans les deux cas la fusion des deux feuillets en cis des membranes. Les mécanismes facilités peuvent impliquer des protéines de transfert solubles (D) ou liés au RE (E), ou encore des protéines "tunnel lipidique" (F) contenant un hypothétique canal hydrophobe permettant l'échange rapide de lipides entre les membranes.*

.

Les échanges médiés par les protéines (Figure 16D et E) ont été extensivement décrits notamment pour les échanges entre membrane plasmique et RE. Ceux-ci peuvent être dues à l'action des protéines Oxysterol binding protein (OSBP), OSBP-related proteins (ORP) et Oxystérol homology binding homology (Osh). Les OSBP ont été décrites comme responsable de l'échange PI4P/stérol entre le RE et la membrane plasmique. Ces protéines délivrent le cholestérol à la membrane plasmique et transportent le PI4P dans l'autre sens (Olkkonen, 2015). Les protéines ORP5, ORP8, Osh6 et Osh7 sont impliquées dans l'apport de PS à la membrane plasmique et transportent les PI4P depuis la membrane plasmique vers le RE (Moser et al 2015). Ces protéines sont localisées dans le RE où elles interagissent avec des protéines de type VAPs (pour Vesicule associated membrane protein-associated protein) par l'intermédiaire d'un motif distal FFAT (two phenylalanine in acidic tract). Les protéines ORP sont liées à la membrane plasmique par un plekstrin homology domain qui lie les phosphoinositides. In vitro, ces protéines semblent ne pas présenter de spécificité envers l'un ou l'autre des lipides transportés en fonction de la membrane avec laquelle il est associé. Ainsi l'unidirectionnalité du transport est assurée par le fait que les PI4P sont hydrolysés en DAG au niveau du RE (Raiborg 2016). Certaines protéines, les ceramide transfert protein (CERT) et sterol transfert protein de type D (STarD), sont partiellement solubles et ne seraient pas liées à des protéines du RE, mais ont des domaines de liaisons aux

membranes : pour CERT, un domaine RE, pour STarD un domaine Golgi. Elles sont impliquées dans le transfert des stérols depuis le RE vers la MP (Lev, 2010).

Le postulat de transfert de lipides par tunnel protéique (Figure 16F), à savoir un transfert direct par tunnel protéique hydrophobe a été émis par (Koivuniemi et al., 2012) . Parmi les protéines impliquées dans ce type de transfert, on trouve les Extended-synaptotagmin (E-syst) qui ont été décrites dans les neurones de rat comme des protéines participant à un complexe localisé dans le RE et présentant de nombreux sites de liaison au Ca^{2+} (Lee et al., 2016). Les protéines homologues chez S. *cerevisiae* présentent des domaines fonctionnels de liaisons aux lipides nommés Synatotagmin like mitochondrial lipid binding domain (SMP). Ces domaines sont retrouvés dans les protéines Mmm1/Mdm12p/Mdm34p qui sont les principaux composant du complexe ERMES, permettant les échanges de lipides depuis le RE vers la mitochondrie (voir paragraphe précédent, (Kopec et al., 2010; Kornmann et al., 2009). Cependant, les études de (AhYoung et al., 2015) et (Schauder et al., 2014) mettent en doute le fonctionnement de ces complexes par formation d'un tunnel continue hydrophobe. En effet, le tunnel hydrophobe serait trop court pour joindre les deux membranes. Ainsi, selon ces auteurs, ces complexes formeraient des jonctions entre les membranes avec lesquelles ils interagissent et agiraient comme des navettes à lipides (Quon and Beh, 2015).

3. Le cas particulier des contacts ER-Chloroplaste.

Les sites de contact entre le RE et les chloroplastes sont le lieu d'un trafic lipidique particulièrement intense. Ainsi les PlAM semblent être le siège de l'export comme de l'import de lipides ou de précurseurs des lipides. Bien qu'une partie des acteurs de ces deux voies de transfert ait été récemment caractérisée, les mécanismes impliqués restent globalement mal connus.

Selon le modèle de Füllekrug, la conversion de l'acide gras en Acyl-CoA soluble, pourrait être la force motrice nécessaire à l'export vers le RE par les MCS. En effet, il a été montré que les acyl-ACP thioesterases de la membrane interne et les Acyl-CoA synthases de la membrane externe participent à l'export des acides gras (Pollard and Ohlrogge, 1999), (Schnurr et al., 2002), (Bonaventure et al., 2003). Il a notamment été montré que trois Long Chain Acyl-CoA synthases, localisées dans le RE (LACS1 et LACS8) et dans la membrane interne de l'enveloppe (LACS9), sont impliquées dans l'export des acides gras vers le RE. Le triple mutant lacs1/lacs8/lacs9 présente une diminution de l'export des acides gras. Cependant, comme l'export n'est pas totalement aboli, d'autres acteurs restent à caractériser.

Récemment, une protéine localisée dans la membrane interne de l'enveloppe, FAX1, a été montrée comme étant impliquée dans l'export des acides gras (Li et al., 2015). Par ailleurs, un ABC transporteur, ABC9, localisé dans le RE a été décrit dans le couplage entre production d'acides gras et la désaturation de la PC et des TAG présenté chapitre II (Kim et al., 2013; Xiao and Chye, 2011). De la même façon, des protéines ACBP (Acyl-CoA binding protein) semblent aussi être impliquées. ACBP4 et ACBP5 sont régulées par la lumière comme la synthèse des acides gras, suggérant un lien entre ces protéines et le transfert des acyl CoA. Le mutant KO acbp4 présente une diminution de la quantité de glycérolipides membranaire suggérant que cette protéine cytosolique avec une forte affinité pour les acyl-CoA 18:1 est impliquée dans leur transfert entre les chloroplastes et le RE (Hurlock et al., 2014; Xiao et al., 2009; Xiao and Chye, 2011; Yurchenko et al., 2009). Malgré l'identification de ces protéines, leurs rôles et les mécanismes par lesquelles elles agissent restent à déterminer.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'import de glycérolipides au chloroplaste est essentiel à la synthèse des galactolipides. De plus, la présence de PC au niveau de l'enveloppe du chloroplaste, alors qu'aucune PC synthase n'y est localisée, indique l'existence de transfert de PC depuis le RE vers le chloroplaste (Awai et al., 2001; Boudière et al., 2014; Kelly et al., 2003). Pour autant, les mécanismes de transferts de la PC ou la nature du lipide transféré pour nourrir la synthèse de galactolipides restent sujets à débat. Récemment, des modélisations mathématiques concernant les flux de lipides au niveau de la membrane interne du chloroplaste, ont montré que seul un apport massif de DAG eucaryote dans la membrane interne est cohérent avec les données biologiques de synthèse des galactoplipides, au contraire d'un apport d'AP (Maréchal and Bastien, 2014). Comme l'analyse lipidique des PlAM a montré l'absence de DAG ou d'AP (Andersson et al., 2007b), il se pourrait que le lipide transféré soit la PC à moins que le transfert de DAG ou d'AP soit très rapide après leur formation rendant leur présence indétectable.

Le transfert de PC pourrait se faire par l'intermédiaire du cycle de Lands, lequel convertit la PC en Lyso-PC et acyl-CoA qui sont partiellement soluble et donc transférable d'une membrane à une autre. La PC est d'abord convertie en Lyso-PC ce qui libère un acide gras lui-même converti en acyl-CoA par les LACS. La PC peut ensuite être reconstituée à partir du pool d'acyl-CoA et de la lyso-PC par une lyso-PC acyltransférase localisée à la surface du chloroplaste (Mongrand et al., 2000). Cette hypothèse est cohérente avec le rôle supposé de LACS9 et LACS4, localisées respectivement dans la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste et dans le RE. En effet, le double mutant lacs4/lacs9 présente une forte diminution de la proportion de galactolipides issus de la voie eucaryote (Jessen et al., 2015).

Un autre mécanisme impliqué dans l'apport des structures eucaryotes dans la synthèse des galactolipides implique les protéines TGD. En effet, les mutants des protéines TGD présentent une diminution drastique de la proportion de galactolipides eucaryotes (Roston et al., 2011; Roston et al., 2012; Wang and Benning, 2012; Wang et al., 2012; Xu et al., 2008; Xu et al., 2005; Xu et al., 2010). Le système TGD est composé d'au moins quatre protéines, dont trois, TGD1, TGD2 et TGD3 sont localisées dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. TGD4 forme un tonneau beta au niveau de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste possiblement au niveau des MCS. Les protéines TGD2 et TGD4 lient l'AP. De plus, les mutants TGD présentent une augmentation de la proportion de AP et de MGDG (Roston et al., 2012; Wang et al., 2012; Xu et al., 2005), l'augmentation de la quantité de MGDG pouvant être due à l'activation de MGD1 par l'AP. Aujourd'hui, la nature du squelette lipidique transporté par TGD reste inconnue.

2. Les transferts intramembranaires

Les transferts de lipides entre membranes sont essentiels à l'homéostasie lipidique des cellules eucaryote, mais ces transferts requièrent que les lipides transportés soient préalablement dans le bon feuillet de la membrane donneuse. Les mouvements transmembranaires spontanés des lipides sont, pour la majorité des glycérolipides, relativement lents et ne sont pas cohérents avec les vitesses observées *in vivo*. La partie suivante s'attache à décrire les mécanismes impliqués dans les transferts intermembranaires de lipides.

a. Transferts ATP indépendants

Le RE est le siège de la synthèse des phospholipides, cette synthèse se fait au niveau du feuillet cytosolique, de ce fait la translocation des lipides dans le feuillet lumenal est nécessaire pour l'expansion correcte du RE. Or, le transfert spontané des glycérolipides est trop lent pour équilibrer la quantité de lipides entre les deux feuillets (Figure 4). Ainsi, dès 1973, l'hypothèse que ces mouvements

puissent être dus à des facilitateurs a été émise (Bretscher, 1973). Ces facilitateurs ATP indépendants, nommés à l'origine flippases, ont été renommés flip-floppases/scramblases pour plus de clarté, ces mouvements étant bidirectionnel et le terme flippase ayant été depuis attribué aux ATPases de type P4 (voir paragraphe suivant). L'identification des protéines du RE responsable de ces transferts n'a pas encore été faite à l'exception de RFT1p qui est requise chez la levure pour la translocation des oligosaccharides liés aux lipides entre les deux feuillets du RE (Helenius et al., 2002). Cependant, il a été montré que la simple insertion de peptides permet les mouvements de flip-flop (Kol et al., 2003), ainsi les mouvements de lipides entre les feuillets du RE pourraient être simplement dus aux propriétés des membranes biologiques contenant des protéines. Par ailleurs, ces transferts sont fortement inhibés par le cholestérol principalement présent au niveau de la membrane plasmique et plus généralement de la voie sécrétrice tardive (Rajasekharan and Gummadi, 2012).

Concernant la membrane plasmique, la disruption de l'asymétrie de cette membrane est un facteur important sinon essentiel pour l'apoptose et la reconnaissance par les macrophages de la PS exposée dans le milieu extra cellulaire (Segawa et al., 2011; Suzuki et al., 2013; Suzuki et al., 2014). Une famille de protéines a été récemment identifiée chez l'humain comme candidat pour cette fonction: les protéines Xkr. L'expression de Xkr8 provoque l'exposition de PS dans le feuillet extracellulaire et la reconnaissance par les macrophages dans différentes lignées cellulaires. Cette protéine est spécifique de l'apoptose, et son activité est contrôlée par le clivage de sa queue C-ter par une caspase-3 (Suzuki et al., 2014). D'autres protéines Xkr fonctionneraient sur le même principe et seraient également impliquées dans l'apoptose. Ce mécanisme est conservé dans C. *elegans* où une protéine homologue, CED8, fonctionne de la même façon. Cependant aucune Xkr ou aucun homologue n'a, à ce jour, été caractérisé *in vitro*. L'activité de scramblase reste donc à prouver.

Une autre famille de protéine responsable de l'exposition de la PS dans le feuillet extra-cellulaire sont les protéines de la famille TMEM16, présentes uniquement chez les eucaryotes et activées par le Ca^{2+} (Pedemonte and Galietta, 2014; Suzuki et al., 2013). Les protéines de cette famille transportent les ions Cl^-, les lipides comme TMEM16F, ou les deux (Brunner et al., 2014; Caputo et al., 2008; Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2012a; Yang et al., 2008). Deux homologues fongiques de ces protéines, TMEM16 d'*Aspergillus fumigatus* et TMEM16 de *Nectria haematococca* ont été purifiés et leurs activités ont été montrées en protéoliposomes reconstitués (Brunner et al., 2014; Malvezzi et al., 2013). Par ailleurs, certains récepteurs couplés à des protéines G, comme la rhodopsin, la β_2-Adrenergique receptor et A_{2A} receptor ont une activité scramblase (Goren et al., 2014; Menon et al., 2011).

La disruption de l'asymétrie a par ailleurs été montrée comme nécessitant l'inhibition des flippases ATP dépendantes associées à ces membranes, ce qui au vu de la vitesse relative de ces enzymes semble étonnant: les scramblases décrites semble avoir des vitesses cent fois supérieures à celles des flippases (Buton et al., 1996; Goren et al., 2014; Marx et al., 2000; Vishwakarma et al., 2005). Cependant, l'expression relative de ces différentes enzymes reste inconnue de même qu'une grande partie de leurs régulations.

b. Floppases ATP dépendantes

L'asymétrie des membranes peut être due à deux types de mouvements des lipides: les flippases (voir chapitre suivant) et les floppases. Le flip décrit un mouvement depuis le feuillet extracellulaire/lumenal vers le feuillet cytoplasmique, alors que le flop décrit le mouvement inverse. Le flop des lipides est généralement associé à des protéines appartenant à la famille des ABC-transporteurs (ATP Binding

Cassette Transporteur), bien que certains ABC transporteurs peuvent aussi générer un mouvement de flip (Montigny et al., 2016b). Les ABC transporteurs constituent une très large famille de transporteurs retrouvés chez les bactéries, plantes et animaux. Ils sont impliqués dans le transport de grosses molécules tel que les phospholipides, cholestérol, hèmes et drogues. La mutation de certains de ces transporteurs chez l'humain est responsable de désordres métaboliques sévères (Azarian and Travis, 1997). Leur structure ainsi que leur mode d'action a été caractérisée ces dix dernières années, et bien que nombre d'entre eux aient été montré pour flopper des lipides chez les mammifères, champignons, bactéries et euglènes, à ce jour, aucune n'a été caractérisée pour cette fonction chez la plante (pour revue (Lopez-Marques et al., 2015).

IV. Les ATPases de type P_4

Parmi les protéines impliquées dans le trafic lipidique, les flippases constituant la famille des ATPases de type P_4 jouent un rôle prépondérant. Ces enzymes transfèrent des phospholipides du feuillet lumenal/extracellulaire de la membrane vers le feuillet cytosolique et sont nécessaires à l'asymétrie de la membrane plasmique et des membranes de la voie sécrétrice. Elles jouent également un rôle important dans le trafic vésiculaire endocytique. Les ATPases de type P_4 constituent une sous famille des ATPases de type P regroupant des transporteurs membranaires présents des bactéries, aux plantes et aux mammifères.

1. Les ATPases de type P

a. Phylogénie des ATPases de type P

Les ATPases de type P se distinguent des autres pompes ATP-dépendantes par la présence d'un résidu acide aspartique, dans le motif conservé Acide Asparatique-Lysine-Thréonine-Glycine, transitoirement phosphorylé au cours du cycle catalytique (Montigny et al., 2016a; Pedersen and Carafoli, 1987). Ces enzymes sont classées en cinq familles, P_1-P_5, en fonction de leur phylogénie et de la nature de l'ion ou de la molécule transporté. Les trois premières familles sont divisées en différents sous-groupes en fonction de leur substrat. Les ATPases de type P_{1A} transportent les ions K^+ et ne sont retrouvées que chez les bactéries. Les ATPases de type P_{1B} transportent les métaux lourds tels que les ions Ag^+, Zn^{2+}, Cd^{2+}, et Cu^{2+}. Les ATPases de type P_{2A} transportent les ions Ca^{2+}. SERCA, Sarco(endo)plasmic reticulum ATPase, ou le SPCA (Secretory Pathway $Ca2^+$-ATPase) localisé au niveau de la voie sécrétrice sont deux représentants de cette famille. Les ATPases de type P_{2B} comme la PMCA (Plasma Membrane Ca ATPase) transportent le Ca^{2+} et le Mn^{2+}. Les ATPases de type P_{2C} transportent les ions monovalents et comprennent les Na+/K+-ATPases et H+/K+ATPases. Les ATPases de type P_{2D}qui transportent les ions Na^+ sont retrouvées uniquement chez les champignons. Les ATPases de type P_{3A} transportent les ions H^+, les ATPases de type P_{3B} pompent le Mg^{2+}. Les ATPases de type P_4 sont la seule classe dans cette famille de protéines à transporter des glycérolipides. Les ATPases de type P_5 ont récemment été suggérées comme pouvant être impliquées dans le transport des ions divalent Fe^{2+} et Ca^{2+} (Corradi et al., 2016; Rinaldi et al., 2015).

b. Domaines structuraux des ATPases de type P

La première structure d'une ATPase de type P a été établie (Toyoshima et al., 2000) sur le transporteur de Ca^{2+}de lapin, SERCA1a. De nombreuses études ont été menées depuis, aboutissant à une résolution fine de ces transporteurs d'ions dans les différentes conformations qu'ils prennent au cours de leur cycle catalytique (Olesen et al., 2004; Sorensen et al., 2004; Toyoshima and Inesi, 2004; Toyoshima et al., 2013; Toyoshima et al., 2000; Toyoshima and Nomura, 2002; Toyoshima et al., 2003).

Les ATPases de type P sont des protéines allongées, trois fois plus longues que larges, contenant 10 segments transmembranaires et deux grandes boucles cytosoliques. Les parties Cter et Nter sont également cytosoliques. En termes de structure, on distingue différents domaines structuraux fonctionnels dont quatre sont présents sur les boucles cytosoliques (le domaine activateur A, le domaine de liaison au nucléotide N, le domaine de phosphorylation P et un domaine de régulation R qui n'est pas présent chez toutes les ATPase de type P) et deux domaines membranaires (le domaine de transport T et le domaine de support S). Des domaines régulateurs sont également présents en Cter, ou en Nter ou sur les deux parties terminales (Toyoshima et al., 2007)(Figure 17).

Le domaine Activateur A, est une protéine phosphatase intégrée. Il contient le domaine conservé Threonine-Glycine-Glutamine ou TGE (DGET pour les P_4-ATPases) qui, orienté dans le bon sens, permet la phosphorylation d'un acide aspartique contenu dans le domaine P.

Le domaine de phosphorylation, P, contient l'acide aspartique (D) transitoirement phosphorylé qui caractérise les ATPases de type P (Takahashi et al., 2007). Le motif contenant le D est orienté face au cytosol et est nécessaire à l'activité de ces enzymes. Il est impliqué dans la coordination avec les motifs des domaines N et P (Takahashi et al., 2007). Ce domaine a une structure homologue aux Haloacid-deshalogénase qui sont des protéines généralement solubles impliquées dans des fonctions d'hydrolyse (Aravind et al., 1998).

Le domaine de liaison à l'ATP, N, est le plus variable des domaines cytosoliques et peut présenter de larges insertions ou délétions sur certaines protéines. Sa structure est cependant conservée chez toutes les ATPases de type P. L'ATP se fixe sur ce domaine par l'adénosine, laissant saillir les trois phosphates qui peuvent, par insertion partielle du domaine N dans le domaine P, phosphoryler le domaine P.

Le domaine de transport T est constitué des 6 premiers segments transmembranaires, qui forment un assemblage très flexible qui se déforme lors du cycle catalytique. Chez les pompes à ions, ce domaine constitue un demi canal par lequel les ions entrent et sortent. Il est formé par les segments transmembranaires 2, 4 et 6 dans SERCA1a, (Sorensen et al., 2004; Toyoshima et al., 2000; Toyoshima and Nomura, 2002). Deux segments (2 et 4 dans le cas de SERCA1a) sont déroulés au milieu du plan de la membrane. Il en résulte un espace ouvert où les ions peuvent être coordonnés. Le déroulement de l'hélice α correspondant au segment 4 de SERCA1a est précédé par une proline qui est conservée chez toutes les ATPases de type P suggérant un mécanisme de liaison aux ions/lipides commun à toutes les protéines de cette famille. Le nombre de sites de liaison aux ions peut être de 1 (ATPases de type P_3 et P_{2B}), 2 (ATPases de type P_{2A}), ou 3 (ATPases de type P_{2C}). Dans le dernier cas, le troisième site de liaison est porté par le domaine de support S.

Le domaine de support, S, est un domaine de soutien au domaine T mais il peut avoir dans certaines ATPases (ATPases de type P_2) une fonction supplémentaire de coordination des ions. Dans l'ensemble, ce domaine est le moins conservé des ATPases de type P, il peut être formé par les segments en Cter (ATPases de type P_2, P_3 et P_4), en Nter (ATPases de type P_{1B}) ou des deux dans les ATPases de type P_5 (Palmgren and Nissen, 2011).

Un domaine régulateur R supplémentaire mais non caractéristique est présent chez la plupart des ATPases de type P. Il peut se trouver sur les extrémités Cter (ATPases de type P_{1B}) ou Nter (ATPases de type P_{2C}) ou les deux ensembles (ATPases de type P_3 de plantes). Il peut agir comme auto-inhibiteur en

interagissant avec le reste de la protéine, comme senseur du cation transporté ou encore réguler l'affinité avec le substrat (Palmgren and Nissen, 2011).

Comme nous le verrons par la suite, certaines ATPases de type P fonctionnent avec une sous-unité nécessaire pour la maturation et la sortie du RE, qui semble prendre part au cycle catalytique. Dans certains cas, de petites sous-unités extracytoplasmiques peuvent aussi interagir avec les boucles extracytoplasmiques et stabiliser les conformations de haute et basse affinité (Palmgren and Nissen, 2011).

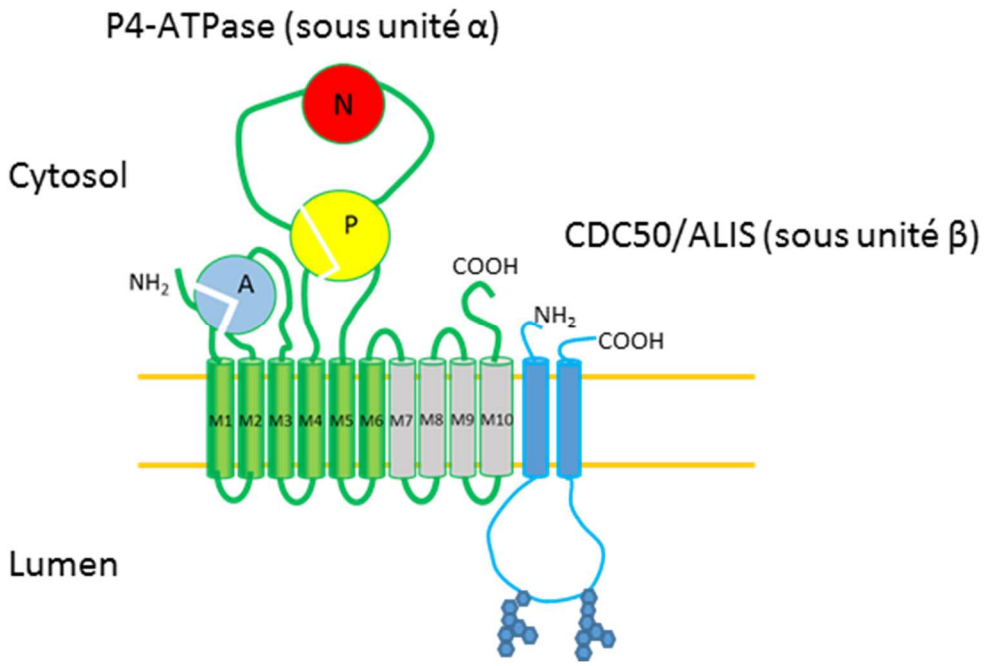


Figure 17 : Représentation schématique des domaines structuraux d'une ATPase de type P_4 et de sa sous-unité β d'après (Lopez-Marques et al., 2015). *Les domaines présentés correspondent aux domaines conservés chez toutes les ATPases de type P décrits ci-dessus. Le domaine A en bleu est le domaine activateur contenant l'activité phosphatase, le domaine N en rouge est le domaine de liaison au nucléotide (en l'occurrence l'ATP), le domaine P en jaune est le domaine de phosphorylation. Les segments transmembranaires impliqués dans le mouvement des lipides (M1 à 6) correspondant au domaine T sont en vert, les segments transmembranaires M 7 à 10 en gris servent de soutien et correspondent au domaine S. la sous-unité β (cdc50 chez la levure ou ALIS chez les plantes), contenant deux segments transmembranaires et dont la boucle extracytoplasmique est fortement glycosylée (représentée par les chaines d'hexagones), est représentée en bleu. M : segment transmembranire.*

c. Mécanisme catalytique des ATPases de type P

Comme pour les ATPases de type P_2, et vraisemblablement pour toutes les ATPases de type P, la phosphorylation de l'aspartate conservé du domaine P est inhibé par le vanadate (Ding et al., 2000), (Lenoir et al., 2009), (Bryde et al., 2010), (Coleman et al., 2012). Ce résultat est similaire à ceux obtenus en 1972 pour les ATPase Na^+/K^+ de type P_{2C} pour lesquelles la déphosphorylation est induite par fixation de l'ion K^+ sur la partie extracytoplasmique de la pompe (Post et al., 1972) (Figure 18).

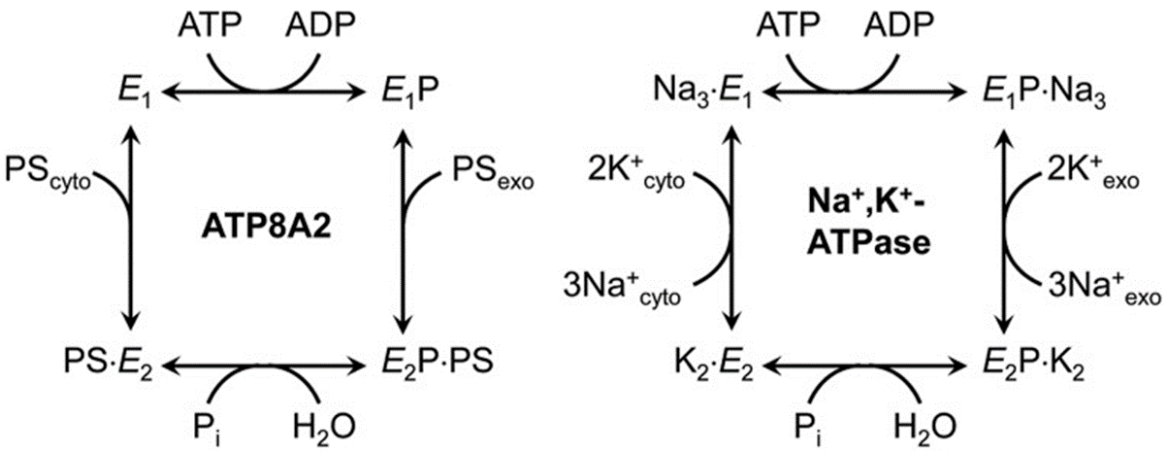


Figure 18 : Cycle catalytique proposé pour ATP8A2 humaine issu des données enzymatiques et de l'analyse de conformation des intermédiaires phosphorylés de ATP8A2 et de l'ATPase a Na^+,K^+ (Coleman et al., 2012). *Ce modèle est basé sur le modèle classique de Post-Albers concernant le cycle catalytique de l'ATPase Na^+/K^+ (Post et al., 1972). Ce modèle illustre l'activation de la déphosphorylation par le substrat provenant du côté extra cytoplasmique de la membrane PS dans le cas de ATP8A2 et le K^+ pour la de l'ATPase a Na^+,K^+. Pour ATP8A2, la phosphorylation dans l'état E1 permettrait la fixation de la PS coté exoplasmique, cela entrainerait un changement de conformation de l'état E1P en E2P, s'en suivrait la déphosphorylation en E2, ce qui permettrait le relargage de la PS du coté cytosolique lors du retour à l'état E1. Ce modèle se base sur les observations faites sur l'ATP à Na+,K+ qui dans son état E1 nécessite la fixation du Na pour être phosphorylé, s'en suit le changement de conformation en E1-P permettant le largage du Na+ coté exoplasmique et le fixation du K+ également du côté exoplasmique, cela entraine le changement de conformation E1-P en E2-P, la déphosphorylation qui s'en suit permet le largage du K+ coté cytosolique et la fixation du Na+ lors du retour à l'état E1.*

Les structures cristallines de haute résolution obtenues pour les Na^+/K^+ ATPases ont montré que lors de la transition E1-P ➔ E2-P le domaine Activateur A, effectue une rotation de 90° qui place le glutamate du motif TGES (DGET chez les ATPases de type P_4) en position pour hydrolyser la liaison phosphoryl-aspartate du domaine P. Par la suite, la liaison avec l'ion engendre une modification de conformation plus restreinte qui déclenche la déphosphorylation (Palmgren and Nissen, 2011; Toyoshima, 2009). Chez les ATPases de type P_4, des changements de conformation similaires sont attendus, car la mutation du glutamate conservé du domaine DGET entraine une abolition de la déphosphorylation de ATP8A2 (Figure 18). Il est à noter que le site de fixation de l'ion sur les ATPases de type P_2 se situe à près de 50 Å du site de déphosphorylation, et que la distance entre le site de fixation du lipide et le site de déphosphorylation est du même ordre grandeur sur les P4-ATPases. Ceci semble indiquer que le changement de conformation suite à la fixation du substrat permet la transmission du signal sur une relativement longue distance.

2. Les ATPases de type P_4

Dans la très large famille des ATPases de type P, les ATPases de type P_4 transportent des lipides. Cette sous famille représente de loin la plus grande sous famille des ATPases de type P, c'est-à-dire celle qui a le plus grand nombre d'isoformes toutes espèces confondues, mais n'est retrouvée que chez les eucaryotes. Ce type de protéines a d'abord été étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'humain. Leur caractérisation a permis de mettre en évidence leur activité de transport de lipides ainsi que leur implication dans divers mécanismes cellulaires tels que l'asymétrie des membranes de la voie sécrétrice, l'endocytose, la dynamique du cytosquelette, le métabolisme des lipides ou la signalisation lipidique. Bien qu'à l'origine ces protéines aient été décrites comme des translocases d'aminophospholipides, les études menées chez l'humain, la levure, les champignons ou les plantes

ont permis de mettre en évidence que ces protéines peuvent avoir différentes spécificités de substrat et éventuellement transporter d'autres lipides comme les lysolipides ou les alkylphospholipides synthétiques.

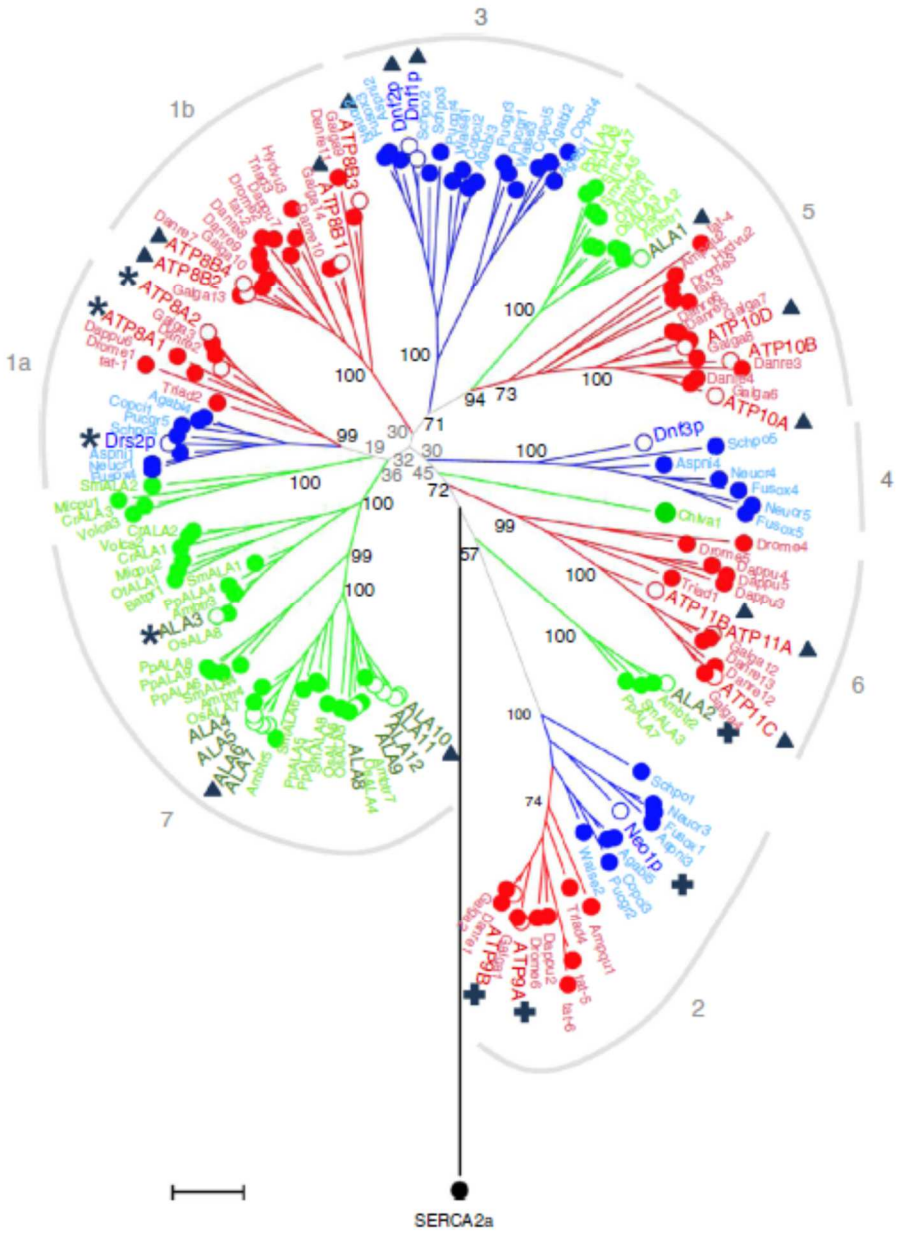


Figure 19 : **Phylogénie des ATPases de type P_4, issu de (Poulsen et al., 2015) :** Arbre phylogénétique de plus forte probabilité pour 162 ATPases de type P_4 identifiées bioinformatiquement dans les génomes de 27 organismes sur la base de 1)- l'homologie avec la flippase de levure Drs2p et 2)- la conservation de motifs propres aux ATPases de type P_4. Analyse bioinformatique de l'homologie effectuée avec le software Phylogeny. L'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode de plus forte probabilité basée sur le modèle basé sur la matrice JTT (Jones et al., 1992). En utilisant les algorithmes BioNJ et Neighhbor-join, les auteurs ont obtenu 563 arbres putatifs différents. Le placement des nœuds est déduit de l'analyse de 500 arbres générés et le pourcentage d'arbres ayant le même nœud est indiqué en noir. On distingue 7 classes d'ATPases de type P_4 dont la première est divisée en deux sous-classes 1a et 1b. Il est à noter que la classe 7 apparait comme étant un groupe monophylétique propre aux plantes. La séquence de l'ATPase de type P_2, SERCA2a, a été prise racine Les localisations intracellulaires connues sont indiquées par les signes suivants : plus: endomembranes, triangle: membrane plasmique, astérisque: trans Golgi. En bleu sont représentés les isoformes des champignon, en vert de plantes, en rouge ceux de mammifères. Abréviations: Ambtr, Amborella trichopoda; Batpr, Bathycoccus prasinos; Chlva, Chlorella variabili; Cr,

Chlamydomonas reinhardtii; Micpu, Micromonas pusilla; Pp, Physcomitrella patens; Os, Oryza sativa; Ot, Ostreococcus tauri; Sm, Selaginella moellendorffii; Volca, Volvox carteri; Drs2p, Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p, and Neo1p sont les ATPases de type P_4 de Saccharomyces cerevisiae; Agabi, Agaricus bisporus; Aspi, Aspergillus nidulans; Copci, Coprinopsis cinerea; Fo, Fusarium oxysporum; Neucr, Neurospora crassa; Pucgr, Puccinia graminis; Schpo, Schizosaccharomyces pombe; andWalse, Wallemia sebi; Animalia: ATP8-11, ATPases de type P_4 d'Homo sapiens; Galga, Gallus gallus; Danre, Danio rerio; Dappu, Daphnia pulex; Drome, Drosophila melanogaster; tat1-5, ATPases de type P_4 de Caenorhabditis elegans; Hydvu, Hydra vulgaris; Ampqu, Amphimedon queenslandica; Triad, Trichoplax adhaerens; and SERCA2a, ATPase de type P_2 de Oryctolagus cuniculus (P05023).

a. Phylogénie des ATPases de type P_4

Chez la levure Saccharomyces cerevisiae cinq ATPases de type P_4 ont été identifiées: Drs2p, Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p et Neo1p. Seule Neo1p a été montrée comme étant essentielle. Le génome humain comporte 14 ATPases de type P_4. Certaines mutations dans une de ces protéines, ATP8B1, provoquent la maladie autosomale rare: la cholestase intrahépatique progressive familiale (PFIC12 ou maladie de Byler).

Chez *Arabidopsis thaliana*, on trouve 12 ATPases de type P_4 nommées ALA (pour Aminophospholipides ATPase). La première étude phylogénétique des ATPases de type P_4 (Paulusma and Elferink, 2010) réalisée sur la base des séquences protéiques avait montré une division de cette famille protéique en six classes. Dans cette étude, ALA3 à12 étaient regroupées au sein de la même classe. Plus récemment, (Poulsen et al., 2015) a effectué une autre étude se basant notamment sur les séquences consensus plus récemment caractérisées. Les résultats de cette étude montrent une division en sept classes, dans lesquelles les six classes précédemment identifiées sont globalement conservées, alors qu'une septième classe regroupant ALA3 à12 apparait comme une classe indépendante spécifique des plantes (Figure 19). Les protéines de cette dernière classe sont très proches et présentent plus de 75% d'identité entre elles ; elles apparaissent à la fois chez les algues vertes, les mousses, les lycopodes, et les plantes supérieures (Figure 19). Cela suggère que cette classe d'ATPases de type P_4 était présente chez les premières algues vertes et que ces gènes se seraient dupliqués au cours de l'évolution. Les liens génétiques entre les différents groupes restent cependant sujets à débat.

b. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des ATPases de type P_4 a fait l'objet de nombreuses études. Cependant du fait de l'absence de structure cristalline obtenue pour cette famille de protéines, le mécanisme mis en jeu reste mal connu. Les prédictions bio-informatiques concernant la topologie et les domaines structuraux ainsi que la présence de domaines de phosphorylation et déphosphorylation conservés entre les ATPases de type P_2 et P_4 indiquent un mécanisme catalytique commun pour ces deux familles d'enzymes (18).

Le cycle catalytique a été étudié principalement pour Drs2p de levure et ATP8A2 humaine. Les études concernant ATP8A2 ont montré que la déphosphorylation de l'état E2-P en E2 est induite par le lipide substrat, en l'occurrence PS et PE mais pas par la PC (Coleman et al., 2013; Coleman et al., 2012). Ce résultat est similaire à ceux obtenus en 1972 pour les ATPase Na^+/K^+ de type P_{2C} pour lesquelles la déphosphorylation est induite par fixation de l'ion K^+ sur la partie extracytoplasmique de la pompe (Post et al., 1972) (Figure 18). La déphosphorylation de Drs2p est aussi activée par la PS-son substrat-, mais la liaison de phosphatidylinositol-4-phosphate, PI(4)P, sur la partie régulatrice en Cter est nécessaire. L'absence de Pi(4)P résulte en une auto-inhibition de l'enzyme. Il semblerait que la partie Cter, en absence de Pi(4)P, interfère avec le positionnement du domaine A nécessaire à la déphosphorylation (Montigny et al., 2016b). Cependant même en présence de Pi(4)P, la vitesse

catalytique de Drs2p est inférieure d'un à deux ordres de grandeur à celle de ATP8A2, ATP8A2 ayant une vitesse comparable à celles des ATPases de type P_2. La vitesse catalytique élevée de ATP8A2 pourrait être nécessaire au maintien de l'asymétrie des membranes où est exprimée ATP8A2, particulièrement, dans les cellules de la rétine, où la forte concentration d'Opsines, les photorécepteurs de la rétine, engendre une activité floppase importante (Jacquot et al., 2012). ATP8A2 pourrait donc servir dans ces cellules à contrecarrer le flop de PE et PS provoqué par les Opsines. Il faut cependant garder à l'esprit qu'il y a relativement peu de conservation entre ATP8A2 et Drs2p. Par exemple, le motif RMKKQR liant le PI(4)P sur Drs2p n'est pas présent dans ATP8A2.

Il a été émis l'hypothèse selon laquelle les ATPases de type P_4 pourraient également transporter des ions. Or ni Drs2p, ni ATP8A2, ne montrent d'augmentation de vitesse catalytique pour aucun des ions testés (Coleman et al., 2012; Jacquot et al., 2012). Le substrat non lipide candidat le plus probable serait l'ion H^+, mais ATP8A2 ne présente pas de variation significative de son activité entre pH 6,5 et pH 9, rendant improbable cette hypothèse (Coleman et al., 2012). Le seul ion ayant un effet sur l'activité des ATPases de type P_4 est l'ion Mg^{2+} qui comme sur les autres ATPases de type P a un rôle de catalyseur de la phosphorylation.

L'idée selon laquelle les ATPases de type P_4 auraient le même mécanisme catalytique que les pompes à ions pose par ailleurs un problème de dimension, souvent appelé dans la littérature "the giant substrat problem". En effet, les ions transportés par les ATPases de type P_2 ont une taille d'environ 2 Å, les lipides ont quant à eux une longueur de l'ordre de 20 Å et une tête polaire de 5 Å. De plus, les ATPases de type P_2 transportent les ions par occlusion dans une poche hydrophile entre les segments transmembranaires (STM) 4, 5,6 et 8. Enfin, se pose le problème de l'orientation du lipide qui doit effectuer une rotation à 180° pour positionner sa tête polaire côté cytosolique après son transport.

Les expériences de purification du tandem ATP8A2 avec sa sous unité CDC50A ont permis de montrer, qu'à elles seules, ces deux protéines avaient une activité de flippase permettant une approche par mutagénèse dirigée (Coleman and Molday, 2011; Coleman et al., 2013; Coleman et al., 2012). L'approche par mutagenèse dirigée a montré que la lysine 873 sur le segment transmembranaire 5 de ATP8A2 est critique pour son affinité avec la PS et la PE. En effet, les mutants K873A et K873E et plus faiblement le mutant K873R diminuent leur affinité pour la PS et la PE, ce qui indique que la charge positive de ce résidu est importante pour la liaison avec le lipide substrat (Coleman et al., 2012). Cette lysine se trouve à la même position qu'une sérine également critique pour l'affinité avec le substrat dans une Na^+/K^+ ATPase (Blostein et al., 1997; Pedersen and Carafoli, 1987; Shinoda et al., 2009). De plus, une mutation sur l'asparagine N874 adjacente à la lysine précédemment citée provoque une diminution significative de l'activité dans les Na^+/K^+ et Ca^{2+} ATPases de type P_2 et aussi sur ATP8A2 (Coleman et al., 2012). Ces résultats vont donc dans le sens d'une similarité de mécanisme catalytique malgré la différence de taille du substrat transporté.

Ainsi il apparait que les similarités entre ATPases de type P_2 et P_4 ne soient pas restreintes aux mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation mais qu'elles s'étendent au mode de transport du substrat. De ces travaux, a émergé l'hypothèse du "transport classique", dans laquelle les lipides comme les ions dans les ATPases de type P_2 seraient occultés entre les segments transmembranaires 5, 6 et 7. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que la structure de l'ATPase de type P_3 (pompe à H^+) de plante, AHA, fait apparaitre une large cavité centrale contenant de l'eau (Pedemonte and Galietta, 2014). La présence de cette cavité serait due à l'absence dans cette protéine de la plupart des acides aminés chargés négativement qui réticulent les segments transmembranaires entre eux dans

les ATPases de type P_2. Or cette absence d'acides aminés chargés négativement dans les segments transmembranaires est retrouvée dans les ATPases de type P_4. En l'absence de données de structure sur les ATPases de type P_4, il est pour l'heure impossible d'infirmer cette hypothèse, mais d'autres modèles sont à l'étude.

Parmi ces modèles alternatifs se trouve celui du "transport périphérique", dans lequel seule la tête polaire du lipide serait prise en charge laissant la queue du lipide glisser sur les lipides de la membrane. Ce modèle s'appuie sur la structure récemment résolue d'une scramblase, TMEM16, qui équilibre PS et PE entre les deux feuillets de la membrane et qui contient un large sillon hydrophile de 8 à 11 Å de large s'étendant en colimaçon sur toute la longueur de la partie transmembranaire de la scramblase (Brunner et al., 2014) (Figure 20).

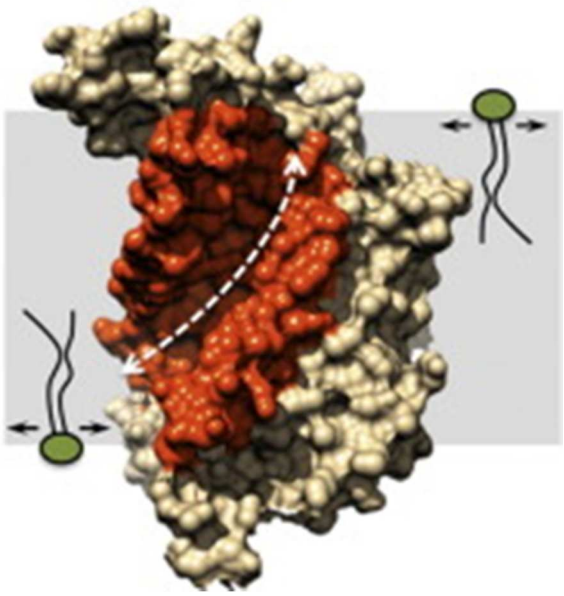


Figure 20 : Illustration présentant le sillon au sein des segments transmembranaires de la scramblase de Nectria haematococca, nhTMEM16. *Seule la partie transmembranaire est montrée par souci de clarté, les hélices formant le sillon hydrophile sont en rouge, le reste des domaines transmembranaires est coloré en beige. La voie de passage du lipide proposée est représentée par la flèche blanche. Tiré de (Montigny et al., 2016a).*

Les premiers indices quant à la position supposée de cette rainure sur les ATPases de type P_4, proviennent de l'étude comparative des ATPases de type P_4de levure Dnf1p et Drs2p qui ont pour substrat respectivement la PC et la PS. La recherche de résidus impliqués dans la spécificité de substrat de ces protéines par mutations ponctuelles et par génération de chimères a mis en évidence l'implication forte d'une asparagine dans le segment transmembranaire 3 (N550 dans Dnf1p et N302 dans ATP8A2), et d'une phénylalanine/tyrosine dans le segment transmembranaire 4 (Y618 dans Dnf1p et L367 dans ATP8A2). Vu leur importance dans la sélectivité de substrat, il est raisonnable de penser que ces résidus soient sur le passage emprunté par les lipides. Or par analogie de structure avec les ATPases de type P_2 à Ca^{2+}, ces résidus sont à la périphérie des enzymes (Baldridge and Graham, 2012, 2013).

Un autre modèle avancé plus récemment est celui dit "la porte hydrophobe". Suite à l'identification dans ATP8A2 au milieu du segment transmembranaire 4 d'une isoleucine, I364, qui est conservée chez toutes les ATPases de type P_4 et qui se trouve à la même position qu'un résidu glutamate clef dans le

transport des ions des ATPases de type P_2. En effet, ce glutamate fonctionnerait comme une porte se liant à l'ion et le déplaçant d'un côté à l'autre de la membrane. Ce mouvement est dû au fait que le segment transmembranaire 4, contenant le glutamate chez les ATPase de type P_2 ou l'isoleucine chez les ATPases de type P_4, se déplace verticalement au cours du cycle catalytique à la manière d'une tige de pompe (Olesen et al., 2004; Toyoshima, 2009; Vilsen and Andersen, 1998).De plus, une mutation de cette isoleucine a été la première et la seule mutation reconnue comme responsable d'une maladie chez l'homme en lien avec ATP8A2 (Onat et al., 2013). Quand l'homologue bovin de cette protéine est exprimé avec une mutation identique dans des cellules en culture, on assiste à une abolition du transport des lipides et une réduction de l'activité ATPase. L'analyse du cycle catalytique de différentes protéines mutées sur ce résidu amène à la conclusion que ce résidu est proche du passage de la tête polaire de la PS, et que cette isoleucine est critique pour le relargage du lipide du côté cytosolique de la membrane (Vestergaard et al., 2014).

En l'absence de données structurelles, le rôle de I364 a été étudié sur un modèle informatique basée sur l'homologie pour les états E2-P et E2 (seuls états où le lipide est lié à la protéine, voir Figure 18), en partant d'alignements multiples avec l'ATPase de type P_2 SERCA dont la structure est connue. Les simulations de dynamique moléculaire ont mis en évidence la présence d'une rainure entre les segments transmembranaires 1, 2 et 4. Cette rainure est plus large que dans les ATPases de type P_2 et pourrait être impliquée dans le transport d'un lipide (Musgaard et al., 2012; Vestergaard et al., 2014). Dans cette rainure, se trouverait une quantité substantielle d'eau qui se regrouperait en deux poches distinctes côtés cyto et exoplasmique séparées par un regroupement d'acides aminés hydrophobes dont I376. Cette rainure hydratée a une taille cohérente avec le passage de la tête polaire de la PS et est suffisamment périphérique pour que la queue hydrophobe du lipide reste en dehors de la protéine. Dans les ATPases de type P_4, la tête polaire doit être solvatée dans l'eau pour faciliter son mouvement, et dans ce modèle il apparait que I364 se déplace entre les états E1-P et E2 et pourrait effectivement fonctionner comme une porte hydrophobe repoussant l'eau et la tête polaire côté cytosolique contre le gradient de concentration du lipide (Vestergaard et al., 2014). L'analyse par mutagénèse dirigée des ATPases de type P_4 a identifié d'autres résidus adjacents comme faisant partie de cette porte hydrophobe, comme I115 du segment transmembranaire 2. Il a aussi été montré que le résidu polaire N359 du segment transmembranaire 4 est impliqué dans la reconnaissance du substrat. Ainsi la voie "des portes hydrophobes" pourrait être relativement similaire chez les ATPases ne pompant qu'un ion à la fois comme pour les lipides.

c. CDC50 et ALIS, les sous unités β des ATPases de type P_4

La sous unité catalytique des ATPases de type P_4 interagit avec une sous-unité β de la famille des Cdc50. Cette sous-unité β est requise pour la maturation fonctionnelle de l'ATPase de type P_4. D'un point de vue structurel, elle contient deux segments transmembranaires et une large boucle exoplasmique fortement glycosylée (Costa et al., 2016; Vestergaard et al., 2015) (Figure 17). Elle présente de fortes similarités de structure avec les sous-unités accessoires β et γ des Na^+/K^+ ATPase, ce qui pourrait suggérer des rôles similaires. La Cdc50 agirait comme une chaperonne requise pour la sortie du complexe du RE vers sa localisation finale et elle pourrait jouer un rôle dans l'activité catalytique de l'ATPase de type P_4.

La fonction de chaperonne a été démontrée par le fait que l'association entre l'ATPase et sa sous-unité β est requise pour l'export du complexe depuis le RE (Bryde et al., 2010; Paulusma and Elferink, 2010; Perez-Victoria et al., 2006; Poulsen et al., 2008b; Poulsen et al., 2015; Saito et al., 2004). Il est à noter

que certaines ATPases de type P_4 ont la capacité de sortir du RE sans interagir avec une Cdc50, comme Neo1p de levure ou les ATPases de type P_4 de mammifères, ATP9 et ATP9B (Takatsu et al., 2011).

Les études menées sur la levure *S cerevisiae* ont montré que la sous-unité β est non seulement nécessaire pour la sortie du complexe du RE, mais aussi pour son adressage vers les membranes cibles. En effet, Drs2p et sa sous unité Cdc50p sont localisées au niveau du réseau trans-Golgien, alors que Dnf1p et Dnf2p qui partagent la même sous-unité Lem3p, sont localisées avec Lem3p au niveau de la membrane plasmique. Cependant, dans les organismes multicellulaires, il semble que la situation est différente. Les ATPases de type P_4 ALA1, ALA2 et ALA3 d'*Arabidopsis thaliana* peuvent interagir indifféremment avec les trois mêmes sous-unités β, mais leur localisation finale, qui est différente pour chacune des ALA ne dépend pas de la sous-unité avec laquelle elles interagissent (Lopez-Marques et al., 2010; Lopez-Marques et al., 2012). De la même façon, différentes ATPases de type P_4 humaines peuvent interagir avec trois homologues de CDC50 et chaque interaction permet la sortie du RE (Bryde et al., 2010). Il est possible que les interactions des ATPases de type P_4 avec les sous-unités β aient évoluées différemment dans les organismes multicellulaires par rapport à la levure. Dans la levure, toutes les ATPases de type P_4 et leurs sous-unités β sont exprimées de concert dans la même cellule, et il pourrait être nécessaire pour la fonction de ces protéines que chaque sous-unité β ait une spécificité d'interaction et de localisation avec la sous unité catalytique. Dans les organismes multicellulaires, l'expression des différentes protéines peut être contrôlée temporellement et spatialement limitant les interactions et suggérant une possibilité d'intégration physiologique.

Les sous-unités β semblent également avoir un rôle dans le cycle catalytique des ATPases de type P_4. Il a été suggéré que la translocation du lipide se fasse au niveau de l'interface entre l'ATPase de type P_4 et sa sous-unité β. La sous-unité β pourrait ainsi contribuer directement à la spécificité de substrat du complexe (Coleman and Molday, 2011; Puts and Holthuis, 2009; Zhou et al., 2014). Cette idée est cohérente avec le fait que les ATPases de type P_4 de levure Drs2p et Dnf3p, qui résident toutes deux dans le réseau trans-Golgien et ont une spécificité de substrat différente, interagissent avec deux sous-unité β différentes : Drs2p interagit avec Cdc50p et Dnf3p interagit avec LEM3 (Alder-Baerens et al., 2006). Au contraire, Dnf1p et Dnf2p qui sont localisées à la membrane plasmique et ont toutes deux la même spécificité de substrat interagissent avec la même sous unité β: Lem3p (Furuta et al., 2007; Pomorski et al., 2003; Saito et al., 2004). Cependant, les expériences de coexpression des ATPases de type P_4 de plantes avec les différentes sous-unités β ne montrent pas d'influence de la sous-unité β sur la spécificité de lipide transporté (Lopez-Marques et al., 2010). Récemment, certains résidus de l'ATPase de type P_4 ont été identifiés chez la levure comme étant responsable de la sélectivité de substrat, ce qui pourrait aller dans le sens que seule l'ATPase est impliquée dans la spécificité du substrat (Baldridge and Graham, 2013). En fait, sur le modèle du fonctionnement établi pour les ATPases de type P_{2C}, les transporteurs de Na^+/K^+, la protéine Cdc50p pourrait être impliquée dans le cycle catalytique de l'ATPase de type P_4 et aider à la formation d'un site de liaison de haute affinité avec les phospholipides (Lenoir et al., 2009; Stone and Williamson, 2012). Le rôle exact de la sous-unité β dans le transport des lipides reste au final à préciser.

Le rôle des CDC50 ou ALIS dans le cycle catalytique reste mal compris. Récemment un crible de 141 mutations ponctuelles d'ATP8A2 a mis en avant que six de ces mutations affectent indirectement la glycosylation de la protéine CDC50 sous-unité d'ATP8A2. Cela suggère que l'interaction avec ATP8A2 est nécessaire à la glycosylation de CDC50 (Vestergaard et al., 2015). De façon intéressante, les modèles informatiques montrent que quatre des six résidus impliqués sont quasiment alignés à la

périphérie d'ATP8A2, entre les segments transmembranaires 1,3 et 4 et sont orientés vers la position supposée de la rainure. Ainsi, il se pourrait que CDC50 soit localisée au niveau de cette rainure, ce qui placerait son domaine exoplasmique au niveau du site d'entrée de la porte hydrophobe, lui permettant de promouvoir directement la liaison entre cette porte et le substrat hydrophobe (Andersen et al., 2016).

d. Rôle et fonction des ATPases de type P_4

La caractérisation de mutants de levure a montré que les ATPases de type P_4 sont essentielles pour l'établissement et le maintien de l'asymétrie des membranes. Le double mutant *dnf1/dnf2* présente une exposition de PS à la surface de la membrane plasmique modifiant les propriétés d'adhérence de l'organisme (Chen et al., 2006; Pomorski et al., 2003). D'autre part, la disruption des gènes Drs2 et Dnf3, provoque la perte de l'asymétrie de la PS des vésicules post Golgiennes, et inhibe le transport de ces vésicules (Alder-Baerens et al., 2006).

La caractérisation enzymatique des ATPases de type P_4 a montré qu'elles peuvent, selon la protéine considérée, transporter divers lipides avec plus ou moins de spécificité pour revue (Lopez-Marques et al., 2014). Certaines ATPases de type P_4 parmi lesquelles Dnf1p, Dnf2p, et Dnf3p flippent plus spécifiquement la PC. Etant donné que la PC est majoritairement dans le feuillet extracytoplasmique de la membrane plasmique et des vésicules post Golgiennes (voir partie I.3 sur l'asymétrie des membranes), la spécificité de Dnf1p, Dnf2p, et Dnf3p pour la PC, suggère d'autres rôles pour ces ATPases de type P4 que le maintien de l'asymétrie lipidique membranaire (Figure 21).

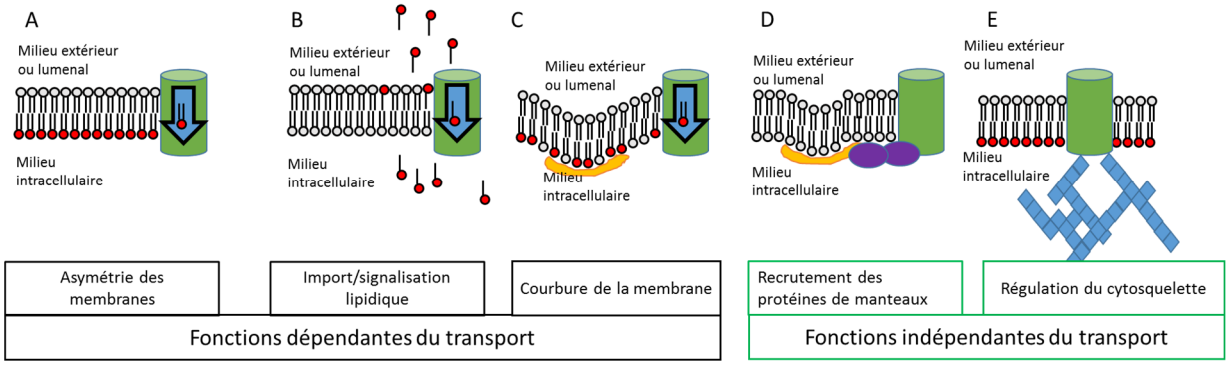


Figure 21: Fonctions cellulaires impliquant les ATPases de type P_4. Les P4-ATPases de type P_4 exercent des fonctions dépendantes et indépendantes de leur activité enzymatique. *Ces fonctions ne sont pas mutuellement exclusives. Le transport actif des lipides peut maintenir l'asymétrie des membranes (A), piéger les lipides ou permettre la signalisation médiée par les lipides(B), ou générer une courbure des membranes (C). Les fonctions indépendantes de l'activité enzymatique peuvent être le recrutement des protéines de manteau des vésicules (D) et la régulation du cytosquelette d'actine (E). Voir texte pour details.*

.

Parmi les fonctions alternatives possibles de ces protéines, il a été proposé qu'elles fonctionnent comme pièges à lipides. Elles permettraient ainsi d'internaliser des lipides et des lysolipides extracellulaires. Cela a été mis en évidence chez *S cerevisiae* qui est incapable d'absorber la lyso-PC et la lyso-PE lorsque les gènes codants pour Dnf1p et Dnf2p ou pour leur sous-unité Lem3p (voir paragraphe suivant) sont inactivés. Dans la souche sauvage, la lyso-PC et la lyso-PE absorbés serait des substrats permettant de générer d'autres lipides (Riekhof and Voelker, 2006; Riekhof et al., 2007). Par ailleurs, dans les cellules humaines, l'homologue de la sous-unité LEM3p de levure, CDC50A (TMEM30a), est impliquée dans l'import de PC à chaines courtes ayant un rôle dans les processus d'inflammation (Chen et al., 2011) (Figure 21).

La mutation de certaines des ATPases de type P_4 engendre par ailleurs des défauts de formation des vésicules au niveau de la voie sécrétrice ou de l'endocytose. Chez *S cerevisiae*, le double mutant *dnf1/dnf2* présente un défaut de formation des vésicules endocytiques lors de la croissance à basse température (Pomorski et al., 2003). Le mutant *drs2* présente un blocage de la formation des vésicules à clathrine au niveau du Golgi (Chen et al., 1999; Gall et al., 2002). De plus, un mutant thermo-sensible du gène essentiel Neo1 présente un défaut de l'endocytose dépendante de récepteurs, mais aussi un défaut de biogenèse vacuolaire et de tri des protéines vers la vacuole (Hua and Graham, 2003; Wicky et al., 2004). Chez le champignon pathogène du riz *Hagnaporhe grisea*, la mutation d'une de ces enzymes entraine une diminution drastique de la sécrétion d'enzymes et des anomalies de la structure du Golgi. Chez *Caenorhabditis elegans*, une ATPase de type P_4 TAT1, qui a d'abord été décrite comme prévenant l'exposition extracellulaire de la PS, est aussi nécessaire pour l'absorption du vitellus par l'embryon dans l'oocyte et pour les premières étapes de l'endocytose dans l'intestin (Darland-Ransom et al., 2008; Ruaud et al., 2009). Chez *Arabidopsis thaliana*, la mutation du gène codant pour ALA3 engendre une diminution de la sécrétion des vésicules de mucus et de polysaccharides au niveau des racines (Poulsen et al., 2008b). Chez la souris, la mutation du gène codant pour ATP8B5 provoque une perturbation des sécrétions constitutives à basse température (Xu et al., 2009). Ces différentes observations suggèrent au final que les ATPases de type P_4 interviennent dans la formation des vésicules (Andersen et al., 2016; Lopez-Marques et al., 2014).

Il existe deux modèles permettant d'expliquer comment l'activité d'une ATPase de type P_4 peut être à l' origine de la formation des vésicules. Le premier modèle se base sur le fait que la translocation de lipide d'un feuillet à l'autre entraine une courbure de la membrane (Figure 21). Ce modèle est cohérent avec les observations de (Daleke and Huestis, 1989; Seigneuret and Devaux, 1984) montrant que l'application de lipides exogènes sur des globules rouges et leur translocation par les ATPases de type P_4 vers le feuillet cytosolique de la membrane plasmique entraine un changement drastique de la morphologie des globules rouges. De même, la translocation des lipides promeut la formation des vésicules endocytiques et accélère l'endocytose (Farge et al., 1999). Récemment, l'observation de bourgeonnements ATP-dépendants sur des protéoliposomes géants d'érythrocytes semble confirmer que la translocation des lipides par les ATPases de type P_4 est suffisante pour générer une courbure des membranes et la formation de vésicules (Ezanno et al., 2010). La courbure des membranes pourrait alors être reconnue par des protéines contenant des domaines BAR et permettre le recrutement des protéines impliquées dans le processus de vésiculisation (Reynwar et al., 2007) (Figure 21)

L'autre modèle avancé pour expliquer le rôle des ATPases de type P_4 dans la formation des vésicules tient compte du fait que l'activité de translocation des lipides pourrait engendrer localement une augmentation de la concentration en phospholipides dans le feuillet cytosolique de la membrane. Cet accroissement local de la concentration en phospholipides pourrait générer un environnement permissif à la formation de vésicules par le recrutement de protéines essentielles comme les protéines COPII, Arf, et les clathrines (Lopez-Marques et al., 2010). Ce modèle s'appuie également sur le fait que Dnf1p, Dnf2p et leur sous unité Lem3p régulent la dissociation rapide de la protéine cdc42 (Cell Division Cycle 42) de la membrane plasmique, une protéine jouant un rôle centrale dans l'établissement de la polarité cellulaire (Das et al., 2012)

Au-delà de leur activité de transport, il se pourrait que les ATPases de type P_4 puissent servir de protéines structurantes. En effet, les protéines Drs2 et Neo1p de levure interagissent avec des protéines cytosoliques comme des facteurs d'échange de nucléotides et des petites GTPases qui sont

cruciales pour le recrutement des protéines de manteaux vésiculaires (Barbosa et al., 2010; Furuta et al., 2007). La protéine Drs2p interagit aussi avec des enzymes impliquées dans le métabolisme des phosphoinositides, lipides de signalisation importants pour le trafic vésiculaire (Puts and Holthuis, 2009). De plus, différentes études montrent un lien entre les ATPases de type P_4 et le cytosquelette (Figure 18). Par exemple, l'inhibition de l'expression de l'ATPase humaine ATP8B1 engendre une désorganisation du cytosquelette d'actine sans modification de l'asymétrie des membranes (Verhulst et al., 2010). Par ailleurs, les fonctions de Drs2p et Dnf1p de levure sont dépendantes de leur association avec Sla1p, une protéine impliquée dans l'endocytose à clathrine et dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine (Warren et al., 2002). Au final, les ATPases de type P_4 semblent avoir des rôles multiples, permettant en particulier d'établir un lien entre le cytosquelette et des régions spécialisées au sein des membranes.

3. La famille des ALA chez *Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis thaliana*, la famille des ATPases de type P_4 a été déterminée par une recherche de similarité de séquence avec la flippase de levure Drs2p (Gomes et al., 2000). Cette famille contient 12 membres nommés ALA1- à 12. Dans cette famille, ALA3 à12 constituent une classe d'ATPases de type P_4 spécifiques des plantes. Bien que le rôle et la fonction précise de chacune d'elles restent à définir, ALA1, ALA2, ALA 3, ALA6, ALA7 et ALA10 ont fait l'objet d'études permettant d'appréhender leur mécanisme et leur rôle à l'échelle de la cellule. Il existe cinq ALIS dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (ALIS1- à 5). La séquence d'ALIS4 est mal annotée dans TAIR et le gène n'est pas exprimé dans les bases de données. Il s'agit probablement d'un pseudogène. A ce jour, seules ALIS1, 3 et 5 ont été étudiées et sont capables d'interagir non spécifiquement avec différentes ALA.

a. ALA1

ALA1 a été la première ATPase de plante décrite. Le gène codant pour ALA1 a été identifié par recherche de similarité avec le gène DRS2 de levure et validé par complémentation fonctionnel du mutant *drs2p* pour le phénotype de croissance au froid. L'activité de cette protéine a été caractérisée par l'incorporation d'analogues fluorescents des lipides en microsomes reconstitués de levure issus d'une souche délétée pour DRS2p et exprimant ALA1. Cette étude a montré qu'ALA1 transloque la PS mais pas la PC, et que cette protéine semble impliquée dans l'endocytose du fait de sa capacité à rétablir l'endocytose dans le mutant *drs2.* Par ailleurs, une diminution de l'expression de cette protéine par expression d'un ARN antisens engendre une diminution de la résistance au froid des plantes, phénotype similaire au mutant *drs2* de levure (Gomès et al., 2000). Par la suite, il a été montré qu'ALA1-GFP exprimé transitoirement dans l'épiderme de tabac est incapable de quitter le RE sauf si elle est coexprimée avec ALIS1, ALIS3 ou ALIS5. En levure, cependant, la présence d'une ALIS n'est pas requise pour sa localisation à la membrane plasmique (Lopez-Marques et al., 2010). Par ailleurs, cette étude contredit l'étude précédente en montrant qu'ALA1 seule ou en présence d'une ALIS ne pouvait pas complémenter le phénotype de croissance au froid du triple mutant *drs2, dnf1, dnf2* qui est supposé plus fiable pour les expériences de complémentation fonctionnelle chez la levure (Poulsen et al., 2008a).

L'activité de translocation des lipides peut aussi être mise en évidence par utilisation de peptides cytotoxique se liant spécifiquement à la PS (papuamide D), la PE (duramycine), ou la PC (miltefosine). La papuamide D provoque la mort des cellule si la PS est exposée sur le feuillet extracellulaire comme dans le triple mutant *drs2,dnf1,dnf2* de levure mais pas dans la levure sauvage, alors que les deux autres drogues provoquent la mort de la cellule si les lipides ciblés sont internalisés résultant dans la

résistance du triple mutant *drs2,dnf1,dnf2* à ces drogues au contraire de la levure sauvage (Lopez-Marques et al., 2012). Or cette étude a aussi montré qu'ALA1 exprimé seul ne complémente pas le phénotype de résistance/susceptibilité à ces drogues du triple mutant *drs2, dnf1, dnf2*. Mais, son expression avec une ALIS permet de restaurer la résistance à la papuamide D confirmant que la PS est bien flippée par ALA1.

Ces études réalisées uniquement dans des systèmes d'expression hétérologues, ne permettent pas de caractériser le rôle d'ALA1 *in planta*, bien qu'elles nous renseignent sur la spécificité de substrat et l'importance de la présence d'une ALIS pour la localisation et l'activité d'ALA1.

b. ALA2

ALA2 et ALA3 sont relativement proches d'ALA1 alors qu'elles sont nettement plus éloignées des autres ALA: ALA2 partage 27 et 29% d'identité de séquence avec ALA1 et ALA3. ALA2 flippe la PS lorsqu'elle est exprimée avec une ALIS (Lopez-Marques et al., 2012). Lorsqu'ALA2 est fusionnée à la GFP, et qu'elle est exprimée en association avec une ALIS (1 ,3 ou 5), elle est retrouvée au niveau du compartiment prévacuolaire et du RE alors qu'elle n'est présente qu'au niveau du RE en l'absence des ALIS. Les plantes mutantes pour ALA2 présentent des vésicules prévacuolaire anormales qui sont du même type que les anomalies observées dans les mutants de la machinerie vésiculaire (Kotzer et al., 2004; Tse et al., 2004). Quelle que soit l'ALIS avec laquelle ALA2 est exprimée, ALA2 complémente le phénotype du triple mutant *drs2, dnf1, dnf2* et ne présente pas de différence de spécificité de substrat. Cependant selon le phénotype observé, il apparait que la complémentation est plus ou moins forte en fonction de l'ALIS. Avec ALIS3 et ALIS5, la croissance sur papuamide D, montrant le flip de la PS, est plus robuste qu'avec ALIS1, mais c'est avec ALIS1 que la restauration de la croissance au froid est la plus importante (Lopez-Marques et al., 2010).

Ce faisant, il semblerait qu'il y ait à défaut de sélectivité de substrat ou de localisation due à l'ALIS, une modulation de l'activité ou de la fonction d'ALA2 en fonction de la sous unité. Cette fonction semble être en lien avec la voie endocytique *in planta*, mais le rôle exact d'ALA2 dans cette voie reste incertain.

c. ALA3

ALA3 flippe la PE, la PC et la PS, et semble être requise pour la formation de vésicules dans les cellules sécrétrices racinaires (Poulsen et al., 2008a). Elle semble également importante pour le développement normal des trichomes (Zhang and Oppenheimer, 2009). L'étude de (Poulsen et al., 2008a) a montré qu'ALA3 était exprimée aussi bien dans les fleurs, les siliques, le tube pollinique, le tissu vasculaire des jeunes plantules, les cellules de garde ou encore la pointe de la racine. Au niveau subcellulaire, il a été montré qu'ALA3 est localisée, en présence d'une ALIS (1, 3 ou 5), au niveau du Golgi mais retenue au niveau du RE en leur absence. Les plantes mutantes délétées d'ALA3 présentent un défaut de croissance racinaire et foliaire important, attribué au défaut de sécrétion racinaire. Par ailleurs, ces mutants présentent une réduction drastique de la croissance du tube pollinique et du nombre d'ovules résultant en une diminution du nombre de graines. Ce phénotype est drastiquement accru lorsque les plantes sont soumises à des conditions de stress thermique tels que jours chauds suivis de nuits froides (Zhang and Oppenheimer, 2009). Cela semble indiquer que les modifications dues à ALA3 au niveau des endomembranes sont d'une importance critique dans nombre de types cellulaires.

d. ALA6 et ALA7

ALA6 et ALA7 sont les deux ATPases de type P_4 les plus proches chez *Arabidopsis thaliana* ; elles présentent entre elles 89% d'identité. Elles sont les ALA les plus exprimées dans le tube pollinique où

elles représentent 56% des ARNm de cette famille de gènes. La seule étude correspondant à ces gènes a été réalisée par (McDowell et al., 2015). Toutes les données exposées ci-après sont issues de cette étude. Les plantes mutantes KO ala6 ou ala7 présentent un très léger défaut ou une absence de défaut de transmission du pollen, alors que la transmission du pollen est dramatiquement affectée dans le double mutant ala6/ala7. Cela suggère que ces deux protéines ont des fonctions redondantes. Le double mutant ala6/ala7 présente une diminution de la taille et de la vitesse de croissance du tube pollinique résultant en une diminution du nombre de graines par silique de l'ordre de 50% comparé au sauvage, ainsi qu'une diminution de la taille des siliques. De plus, lorsque ces plantes sont soumises à un stress thermique tel que jours chauds et nuits froides, le nombre de graines par silique diminue encore plus drastiquement. L'expression d'ALA6 fusionnée à la GFP ou à la CFP dans les grains de pollen, permet de complémenter le phénotype des doubles mutants ala6, ala7, soulignant la redondance fonctionnelle de ces protéines. La localisation d'ALA6-GFP est observée au niveau de la membrane plasmique et des endomembranes suggérant différentes fonctions au sein du tube pollinique.

En levure, aucune complémentation du triple mutant *drs2, df1, dnf2* n'a pu être observée avec ALA6 ou ALA7, de même qu'aucune internalisation d'analogues fluorescents de lipide n'a été observée. Par ailleurs, les grains de pollens issus du double mutant sont incapables d'incorporer ou d'être colorés par les sondes liposolubles de type FM alors que d'autres types de sondes comme le colorant de stérols, Filipine, est capable de les colorer.

Pour autant, l'analyse lipidique des grains de pollen du double mutant présente certaines variations tant au niveau de la composition lipidique que de la désaturation de ces lipides. En effet, concernant la composition lipidique globale on observe une nette diminution de la teneur en PI et lyso-PC mais une augmentation de la teneur en AP, DGDG et dans une moindre mesure en MGDG. De plus, il a été observé une augmentation des lipides très désaturés (3 doubles liaisons sur chacun des acides gras) et une légère diminution des formes intermédiaires de désaturation (2 et 3 doubles liaisons au total sur les deux acides gras).

Cette étude est la première mettant en évidence des modifications des teneurs relatives en lipides en lien avec des flippases chez les plantes, cependant l'absence d'analyse poussée sur le trafic lipidique ainsi que l'absence d'argument concernant la spécificité de substrat ne permet pas de disséquer le rôle de ces protéines dans la synthèse des lipides.

4. ALA10, une ATPase de type P_4 remarquable

a. Données bibliographiques concernant ALA10

ALA10 fait partie de la classe des ATPases de type P_4 spécifiques des plantes. Cette protéine a été décrite comme pouvant interagir avec ALIS1, ALIS3, et ALIS5 (Poulsen et al., 2015). En effet, il apparait que quand ALA10-GFP est exprimée seule, de façon transitoire dans les cellules d'épiderme de tabac, sa localisation est restreinte au RE. Mais lorsqu'une ALIS est coexprimée avec ALA10-GFP, on assiste à la relocalisation du signal à la membrane plasmique (Poulsen et al., 2015).

La caractérisation de sa sélectivité de substrat a révélé qu'elle flippe principalement la PC, mais elle peut aussi flipper la PE, la PS et dans une moindre mesure la lyso-PC (Figure 22) (Poulsen et al., 2015). Il s'agit de la première ATPase de type P_4 de plante décrite comme ayant une aussi large gamme de lipide substrat et étant capable de flipper un lysolipide. Ces mesures ont été effectuées au moyen d'analogues fluorescent des lipides sur des levures exprimant ALA10 et ALIS1, dans un contexte

génétique mutant pour *drs2, dnf1, dnf2*. *In planta*, les expériences de fusions transcriptionnelles présentées dans cette étude ont montré qu'ALA10 est principalement exprimée dans les racines et dans les cellules de garde. Les plantes mutantes KO pour ALA10 confirment les données obtenues en levure car elles présentent une diminution de l'incorporation racinaire de NBD-PC et NBD-lyso-PC (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl- PC et lyso-PC, marqueur fluorescent fixé sur acide gras) par rapport au WT. Ainsi, pour ces auteurs, ALA10 favoriserait l'absorption des lipides du sol permettant à la plante de les réincorporer directement dans les lipides membranaires.

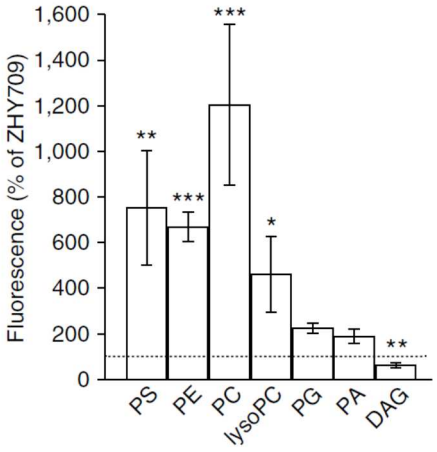


Figure 22 : Mesure d'import d'analogue fluorescent des différents lipides en levure surexprimant ALA10 avec ALIS1. D'après Poulsen etal. 2015. *Les cellules de levure ZHY709 exprimant ALA10+ALIS1 ont été marquées par les NBD-lipides indiqués et analysées par cytométrie de flux. L'accumulation des NBD-lipides est présentée en pourcentage de l'intensité de fluorescence des cellules ZHY709, utilisées en contrôle négatif (ligne pointillée). Les données représentent la moyenne +/- la déviation standard (n=3-17). Significance statistique des différences calculées par t- Test par rapport aux cellules ZHY709, ***P<0.001, **P <0.01, *P<0.05. NBD*=1-Palmitoyl-2-(6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]hexanoyl)-sn-glycero-3-phospholipide.

b. Expression d'ALA10 en réponse aux modifications de la synthèse des galactolipides.

A l'origine, notre intérêt pour ALA10 est né du fait qu'ALA10 est surexprimée dans deux conditions faisant varier la synthèse des galactolipides: le traitement à la Galvestine-1 et la carence de phosphate.

1. ALA10 et l'inhibition de synthèse du MGDG par la Galvestine-1

La Galvestine-1 est une drogue qui a été développée dans le but d'inhiber spécifiquement les MGDG synthases (Botte et al., 2011). Cette molécule a été caractérisée par criblage à haut débit d'une banque de 23360 molécules issues de la collection Cerep. Le crible a été effectué sur la base de l'inhibition *in vitro* de l'activité MGDG synthase de la protéine MGD1 recombinante, en vésicule lipidique d'*E. Coli*. Cette molécule a été caractérisée comme ayant une concentration d'inhibition de 50% de MGD1 (IC50 de 10µM dans ces conditions). Dans des micelles d'enveloppe chloroplastique d'*Arabidopsis thaliana*, l'IC_{50} a une valeur <15µM. En faisant varier les concentrations d'UDP-gal ou de DAG, il a été montré que l'inhibition due à la Galvestine-1 est compétitive avec le DAG mais pas avec l'UDP-gal, montrant ainsi que le Galvestine-1 agit en entrant en compétition contre le DAG pour l'interaction avec les MGDG synthases. *In planta*, la Galvestine-1 inhibe la croissance des racines primaires et secondaires. La croissance des feuilles et des cotylédons est aussi inhibée mais l'anatomie des feuilles indique l'absence d'anomalie de différentiation cellulaire. Les organes photosynthétiques apparaissent chlorotiques, en corrélation avec une absence de développement des thylacoïdes (Botte et al., 2011).

Afin de déterminer les gènes dont l'expression est modifiée par le traitement à la Galvestine-1, une analyse transcriptomique a été effectuée en utilisant une puce à ADN (Affymetrics *Arabidopsis thaliana* ATH1 genome array GeneChip). Les conditions de culture ont été choisies de façon à déterminer l'impact du traitement, de sa dose et de sa durée, sur l'expression des gènes. Pour ce faire les plantes ont été cultivées en présence de DMSO (contrôle), de 100µM ou de 200µM de Galvestine-1; les plantes ainsi traitées ont été récoltées au terme de 3 et 13 jours de traitement. Les résultats de cette expériences ont révélé deux groupes de 599 et 784 gènes respectivement, qui se trouvent être surexprimés d'un facteur deux ou plus, à 3 et à 13 jours de traitement. Parmi ces gènes, celui codant pour ALA10 est surexprimé par rapport à la condition contrôle correspondante d'un facteur 6 à 7 (Botte et al., 2011). Cette surexpression du gène codant pour ALA10 a été validée par RTqPCR, et confirmée au niveau protéique par Western Blot en utilisant un anticorps anti-ALA10.

2. ALA10 et la carence en phosphate.

La carence en phosphate est connue depuis de nombreuses années pour déclencher un remaniement lipidique majeur au sein de la cellule végétale. Cette condition est extrêmement répandue dans la nature, car bien que le phosphate soit relativement abondant dans le sol, il est principalement présent sous forme de complexe avec d'autres éléments le rendant non assimilable par les plantes. Or, il s'agit d'un élément entrant dans la composition de la majeure partie des macromolécules organiques et essentiel à la survie des plantes (Mlodzinska and Zboinska, 2016). Lorsque les plantes se trouvent en condition où le phosphate est limitant, on assiste à un remodelage de la composition lipidique des membranes intracellulaires et des mitochondries. Les analyses lipidiques réalisées sur des suspensions cellulaires cultivées en condition de carence de phosphate ont révélé une augmentation transitoire de la proportion de PC, suivi d'une diminution de la proportion des phospholipides et leur remplacement par du DGDG qui, en condition standard, n'est présent que dans le chloroplaste. Ainsi, la carence en phosphate promeut la synthèse des galactolipides et les échanges entre les membranes extraplastidiales et les chloroplastes (Jouhet et al 2007). Ce remodelage de la composition lipidique des membranes permet ainsi une redistribution du phosphate au sein de la cellule, attendu que les phosphoglycerolipides représentent à eux seuls environs 30% du phosphate cellulaire. Les études précédentes cherchant à déterminer les gènes impliqués dans ce remodelage lipidique, ont révélées que l'expression du gène codant pour ALA10 est augmentée d'un facteur 2 lorsque les plantes sont maintenues en carence pendant 8 jours (Misson et al., 2005). Le fait qu'ALA10 soit surexprimé lors de la carence en phosphate, qui est une condition déclenchant une synthèse massive de galactolipides, suggère là encore qu'ALA10 est un bon candidat dans la recherche d'acteurs de la synthèse des galactolipides.

Comme l'expression d'ALA10 est augmentée en réponse à différentes conditions modifiant la synthèse des galactolipides (inhibition de la synthèse du MGDG ou carence de phosphate) et comme ALA10 est une ATPase de type $P_{4,}$ ALA10 est apparue comme un candidat potentiel dans la recherche d'acteurs de l'homéostasie des glycérolipides chez *Arabidopsis thaliana*. Ma thèse s'est donc consacrée à étudier le rôle d'ALA10 dans l'homéostasie des galactolipides, l'impact des différentes ALIS sur la fonction d'ALA10 et enfin la régulation post-traductionnelle de la protéine ALA10.

Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal

L'étude a été effectuée sur la plante supérieure Arabette (*Arabidopsis thaliana)* pour laquelle les données génomiques sont relativement complètes à ce jour. Du point de vue du métabolisme lipidique, *Arabidopsis thaliana* est une plante en C16, c'est-à-dire qu'elle présente deux origines de synthèse des galactolipides (voir Données bibliographiques II-3): d'une part, les galactolipides originaires de la voie eucaryote se caractérisent par la présence d'un acide gras à 18 atomes de carbone en position *sn-2* du glycérol et d'autre part, les galactolipides originaires de la voie procaryote se caractérisent par la présence d'un acide gras à 16 atomes de carbone en position *sn-2* du glycérol.

1. Obtention des lignées d'insertion d'*Arabidopsis thaliana*

Les études ont été effectuées sur l'écotype Columbia Col0 d'*Arabidopsis thaliana*. Les lignées mutantes ala10, alis5 et pub11 (respectivement lignées SALK_024877, SALK_152601, SALK_029828C) sont issues de la collection du Salk Institute qui a été générée par insertion aléatoire d'ADN-T dans le génome de Col0. La lignée alis1 (lignée GK 727F10) est issue de la collection GABI générée de manière similaire. Les génotypes de chaque mutant ont été vérifiés par PCR (voir Matériel et Méthodes paragraphe IV.1.3) et les lignées homozygotes ont été sélectionnées pour la suite du travail.

2. Culture des plantes sur terreau

Pour les cultures sur terreau, les graines sont incubées deux heures à -80°C afin d'éliminer les œufs de thrips pouvant s'y trouver. Les graines sont ensuite semées sur un mélange terreau/vermiculite 5:1 imbibé avec une dilution de VectoBac (WG Puteaux) (5 mL pour 1 L) pour limiter la prolifération de mouches au cours de la culture. Les bacs de semis sont placés à l'obscurité et à 4°C pendant 48h afin de synchroniser la germination. Les cultures sont ensuite placées en chambre de culture à 20°C sous lumière blanche (90-110 µE) avec une photopériode de 16h de lumière/ 8h d'obscurité pour la condition jours longs et 10h de lumière/ 14h d'obscurité pour la condition jours courts. Le terreau est recouvert de vermiculite pour éviter la ponte des mouches.

3. Culture des plantes in vitro

Pour les cultures *in vitro*, les graines sont stérilisées par deux incubations successives, la première dans de l'éthanol 70% pendant une minute, la deuxième dans une solution de Javel à 1,2 % de chlore actif pendant 12 min. Elles sont ensuite rincées quatre fois à l'eau stérile.

Les graines sont réparties en milieu stérile sur boîtes contenant du milieu Murashige et Skoog (MS Duchefa) ; (Murashige and Skoog, 1962) gélosé (Agar 0,8%), contenant 5 g/L de saccharose. Le milieu est tamponné à pH 5,7 par du MES à la concentration de 0,5 $g.L^{-1}$. Pour synchroniser la germination, les graines sont vernalisées 2 à 3 jours à 4°C avant leur mise en culture proprement dite à une température de 10 ou 20°C et sous lumière blanche (90-110 µE) avec la photopériode requise, jours longs ou jours courts comme indiqué ci-dessus.

Pour faciliter le traitement des plantes par le MG132, certaines cultures ont été faites en milieu liquide dans des plaques multipuits (12 puits). Les graines stérilisées sont déposées dans le même milieu que précédemment mais sans agar. Une dizaine de graines sont déposées au fond de chaque puits d'une plaque de 6 puits, chaque puits contenant 1.5 ml de milieu. La hauteur du milieu ne dépasse pas 2mm

ce qui limite l'appauvrissement du milieu en oxygène au cours de la culture. Au bout de 9 jours de culture le milieu est remplacé pour du milieu neuf contenant soit 50 µM de MG132 et 0.1% de DMSO, soit seulement 0.1% de DMSO pendant 16 heures avant récolte.

4. Culture de cellules d'*Arabidopsis thaliana*

Les cals sont produits à partir de fragments de feuille de plantules âgées de 10 à 15 jours cultivés *in vitro* en milieu gélosé dans les conditions classiques. Les fragments sont déposés sur milieu solide contenant du milieu MS additionné de 3 % (p/v) de saccharose, 0,8 % (p/v) d'Agar et 1,2 mg $.L^{-1}$ de 2,4-dichlorophenoxyacetate de sodium. Après un mois de culture les cals sont transférés et cultivés en milieu liquide MS contenant 3 mM KH_2PO_4, 1,5 % sucrose (p/v), et 1,2mg.L^{-1} de 2,4-dichlorophenoxyacetate de sodium. Les cals sont cultivées à 22°C dans des ballons Kjeldahl contenant 200 mL de milieu de culture. Elles sont maintenues sous une agitation permanente de 125 rpm sur un agitateur horizontal et sous un éclairage constant de 50 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Le repiquage est effectué tous les 7 jours avec 10 mL de cals sédimentés dans 200 mL de milieu neuf.

5. Culture pour sélectionner des plantes transformées

Les plasmides utilisés pour l'obtention des lignées surexprimant les gènes d'intérêts comportent des gènes de sélection différents générant une résistance à la kanamycine ou au BASTA (voir partie III.B.2). Dans le premier cas, de la kanamycine à 50 mg/L est additionnée au milieu de culture in vitro pour sélectionner des mutants porteurs du gène de résistance.

Pour la résistance au Basta, les plantes sont semées sur terreau comme décrit précédemment et sont ensuite traitées par pulvérisation d'une solution de Basta (120 µg/mL de glyphosate) diluée au 1/1000. Le traitement se fait à partir du 10ème jour de croissance et est répété 2 à 4 fois à 4 jours d'intervalle.

Pour les deux types de résistances, la sélection se fait sur les 2 premières générations. A la troisième génération l'homogénéité de chaque lignée est déterminée par un traitement sur une centaine de plantules issues d'une même plante mère. Les lots de graines de troisième génération qui présentent un taux de survie supérieure à 90% sont considérés comme homogènes.

II. Analyse phénotypique de la croissance et du développement

1. Mesure de la croissance

Pour l'analyse statistique de la surface foliaire des plantes, celles –ci sont cultivées *in vitro* en milieu solide MS décrit en (II.C) avec une photopériode de 16h éclairement/8h obscurité. Pour les traitements avec la Galvestine-1 (Botté et al 2011), les plantes sont cultivées sur milieu MS contenant 2 % de saccharose et 0,2 % de Tween 20 et, comme spécifié 0, 100 ou 200 µM de Galvestine-1. Après stratification, les plantes sont placées à 20°C dans l'obscurité pendant 3 jours avant mise en culture pendant 12 jours. Au terme de la culture, chaque boite est photographiée et les images sont traitées avec Image J. Pour chaque image, l'échelle est déterminée en utilisant la largeur de la boite comme référence. Ensuite, pour chaque image, un seuil est déterminé grâce à l'outil color threshold qui permet d'éliminer (attribution d'une valeur colorimétrique au pixel de 0) tous les pixels n'ayant pas la couleur désirée. Cette image est ensuite binarisée ce qui permet l'utilisation de l'outil ANALYSE PARTICULE qui détermine automatiquement la taille de chaque objet, chaque sélection est vérifié

manuellement afin d'éviter la prise en compte du bruit de fond et la non prise en compte de toutes les plantes.

2. Mesure du délai de floraison

Les différentes lignées de plantes sont semées en terreau comme décrit précédemment. 12 graines de chaque lignée sont semées dans des pots indépendants (12x12X10 cm). Pour synchroniser la germination, les graines sont vernalisées à 4°C pendant 4 à 5 jours. Le jour 1 est le jour de mise en chambre de culture. Le déclenchement de la floraison est noté lorsqu'on observe le changement morphologique du méristème apical avec l'apparition du bourgeon floral. On mesure alors le nombre de jours au déclenchement de la floraison. Afin de considérer une éventuelle différence de vitesse de développement des différents plants, le nombre de feuilles est également compté au jour de déclenchement de la floraison.

3. Observation de l'accumulation d'amidon sur plantes entières

Les plantes sont cultivées *in vitro* en milieu solide. Au terme de la culture, les plantes sont récoltées et sont décolorées par des bains successifs d'une dizaine de minutes dans l'éthanol 80 % (v/v) à 50°C jusqu'à décoloration totale. La présence d'amidon est révélée par incubation de 10 min des plantes dans une solution de Lugol (I_2 0,32 % (p/v), KI 0,17 % (p/v). Les plantes sont ensuite rincées deux fois à l'eau avant observation. A froid, l'iode moléculaire (di-iode) est adsorbé par les molécules de polyholosides : il se forme entre l'iode et la molécule glucidique un complexe coloré. Cette coloration est réversible et permet d'observer la présence d'amidon et plus généralement des complexes glucidiques à l'œil nu. La coloration de l'amidon par l'iode résulte de la fixation des molécules de di-iode à l'intérieur des hélices d'amylose à raison d'une molécule pour deux tours d'hélice, chaque tour d'hélice comportant six résidus glucose. La coloration brune caractéristique de la complexion de la molécule de diiode avec les oligosaccharides nécessite la fixation d'au moins trois molécules de di-iode à l'amidon pour pouvoir apparaître ce qui correspond à un oligosaccharide d'au moins 36 résidus glucose.

III. Mesure activité photosynthétique

Les différentes lignées de plantes sont cultivées *in vitro* en milieu solide comme décrit précédemment avec une photopériode de 16h d'éclairement /8h d'obscurité à 20°C ou à 10°C. Avant la mesure, les plantes sont placées 30 min à l'obscurité de manière à ce que le pool de plastoquinoles soit intégralement oxydé. La fluorescence de la chlorophylle est mesurée à température ambiante à l'aide d'un fluorimètre PAM-imaging (Walz, Effeltrich, Germany), comme décrit par (Maxwell and Johnson, 2000); (Sperdouli and Moustakas, 2012). Chaque mesure est effectuée sur 30 plantes en parallèle. En premier lieu, les valeurs F_o (fluorescence minimale de la chl *a* à l'obscurité) et F_m (fluorescence maximale de la chl *a* à l'obscurité) sont mesurées sur les plantes adaptées à l'obscurité. F_m est obtenu avec un flash de lumière saturante (2400 µmol photons m^{-2} s^{-1}, 800 ms) suivi par l'application d'une lumière dite actinique (permettant la mise en place de la photosynthese) afin de quantifier la photosynthèse en conditions basales. Une lumière actinique de faible intensité (90 µE) a été choisie. Cette intensité lumineuse est du même ordre de grandeur que l'illumination utilisée lors de la croissance des plantes, et elle est suffisament faible pour éviter le phénomène de photoinibition. Le temps d'illumination est de 5 minutes et comporte un répétition des mesures de F_0' (fluorescence minimale de la chl *a* à la lumière) et de F_m' (fluorescence maximale de la chl *a* à la lumière) toutes les 10 à 20 s, par la suite la lumiere actinique est éteinte et la succession de flashs de lumiere saturante continue pour 5 min permettant d'observer la relaxation du système (retour à un état où les plastoquinoles sont toute oxydées et ou la phothosynthèse n'est pas active. A partir de ces mesures,

le software Imaging Win clacule automatiquement les valeurs des autres paramètres de fluorescence de la chl *a*. La valeur de F_o' est estimée en utilisant l'approximation d'Oxborough and Baker (Oxborough and Baker, 1997). Les paramètres calculés incluent le rendement quantique de conversion photochimique au sein du PSII ($\Phi_{PSII} = F_m' - F_s)/F_m'$), qui est une estimation de l'efficacité d'utilisation de la lumière absorbée par le PSII pour la photochimie, F_s étant l'état basal relatif de la fluorescence de la chl *a*. L'efficacité relative du transfert d'electrons depuis le PSII (ETR) a été calculé selon Schreiber et al (Oxborough and Baker, 1997).

Pour la mesure du NPQ, l'adaptation des plantes à l'obscurité et la séquence d'illumination (flashs de lumière saturantes et lumière actinique) sont les même que précédemment mais l'intensité de la lumière actinique est de 600 µE, cette intensité lumineuse est suffisamment intense pour déclencher les mécanismes de photoprotection chez Arabidopsis. Parmi les mécanismes de photoprotection chez Arabidopsis, la dissipation thermique de l'énergie lumineuse (NPQ) est l'élément principal. Ce paramètre est calculé par NPQ= $(F_m - F_m')/F_m'$. Le fait de répéter ces mesures tout au long de l'expérience – c'est à dire à l'obscurité, lors de l'allumage de la lumiere actinique puis lors du retour à l'obscurité - permet d'évaluer les vitesses de mise en place et de relaxation du NPQ.

IV. Techniques d'étude des acides nucléiques

1. Techniques d'analyse des plants d'*Arabidopsis thaliana* mutés par insertion

a. Extraction de l'ADN génomique des plantules

L'ADN génomique est extrait d'une jeune feuille prélevée au centre de la rosette. La feuille fraiche est broyée dans 200 µL de tampon Edwards (200 mM Tris HCL pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS). Après broyage, 200 µL de tampon sont ajoutés au broyat. Après 5 min de centrifugation, 200 µL de surnageant sont prélevés auxquels sont ajoutés 200 µL d'isopropanol conduisant à la précipitation de l'ADN. Après 15 min de centrifugation, tout le surnageant est retiré. Le culot est lavé a l'éthanol 70% puis a l'éthanol 90% afin d'éliminer les sels. Pendant 30 min, le culot sèche à l'air libre. Après évaporation complète de l'isopropanol, l'ADN est repris dans 50 µL d'eau stérile puis dosé par spectrophotométrie à 260 nm au nanodrop (Invitrogene). L'ADN est ensuite conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

b. Amplification in vitro de fragments d'ADN

Les fragments d'ADN ont été amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant la *Taq* polymérase "Phusion taq polymérase" (Invitrogene). L'ADN matrice est dilué dans 25 µL de tampon *HF phusion* (Invitrogene), en présence de 10 µM de chaque désoxynucléotide, 250 µM de chaque amorce, 0,25 µL de phusion *Taq* polymérase (Invitrogene). Les tubes contenant le mélange sont placés dans un incubateur programmable (Robocycler/Biorad thermocycler). L'amplification s'effectue en 39 cycles contenant chacun trois étapes : une phase de dénaturation à 95°C, une phase d'hybridation baissant progressivement de 65 à 55°C sur les 10 premiers cycles et une phase d'élongation à 72°C. Le programme d'amplification utilisé est le suivant :

- 1 cycle de 5 min à 94°C, 30 s à 65°C, 2 min à 72°C

- 1 cycle de 30 s à 94°C, 30 s à 64°C, 2 min à 72°C

- 1 cycle de 30 s à 94°C, 30 s à 63°C, 2 min à 72°C

- 1 cycle de 30 s à 94°C, 30 s à 56°C, 2 min à 72°C

- 34 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 55°C, 2 min à 72°C

- 1 cycle de 30 s à 94°C, 30 s à 55°C, 5 min à 72°C

L'efficacité de la réaction d'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose de 10 µL du mélange réactionnel.

c. Amorces utilisées pour le génotypage des mutants ala10, alis1, alis5, klcr2 et pub11

La sélection des mutants homozygotes pour l'insertion d'une étiquette dans le gène d'intérêt est effectuée par PCR sur l'ADN génomique (voir ci-dessus), à l'aide d'un jeu de 3 amorces (Figure 23) permettant d'amplifier spécifiquement soit l'allèle sauvage, soit l'allèle muté. L'amorce oligonucléotide complémentaire de la séquence de l'ADN-T est désignée par les constructeurs du mutant. Elle est située à l'extrémité gauche de l'ADN-T (amorce LB). Utilisée conjointement avec une amorce complémentaire du gène situé du côté de la bordure gauche de l'ADN-T (amorce WT-Fw de ALA10/ALIS1/ALIS5/PUB11/KLCR2), elle amplifie la jonction ADN-T/gène et révèle l'allèle muté (Figure 24). D'autre part, un couple d'amorces spécifiques et complémentaires au gène d'intérêt est également choisi de part et d'autre de l'insertion afin d'amplifier l'allèle sauvage (amorces WT-Fw de ALA10/ALIS1/ALIS5/PUB11/KLCR2 et WT-Rv de ALA10/ALIS1/ALIS5/PUB11/KLCR2).

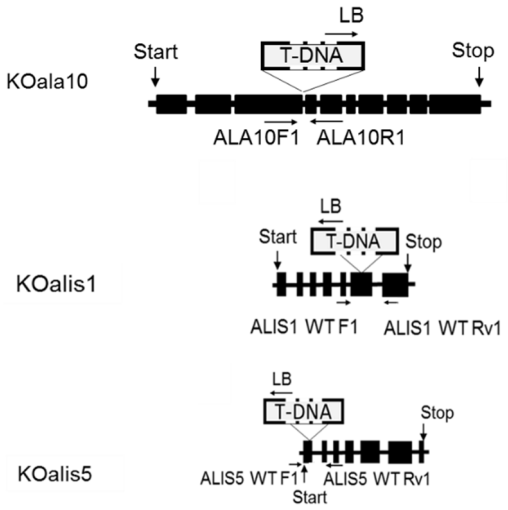


Figure 23 : Représentation schématique des insertions d'ADNt et amorces associées dans les lignées mutantes pour KOala10, KOalis1, et KOalis5*. Les exons sont représentés par les rectangles noirs, les amorces par les flèches horizontales.*

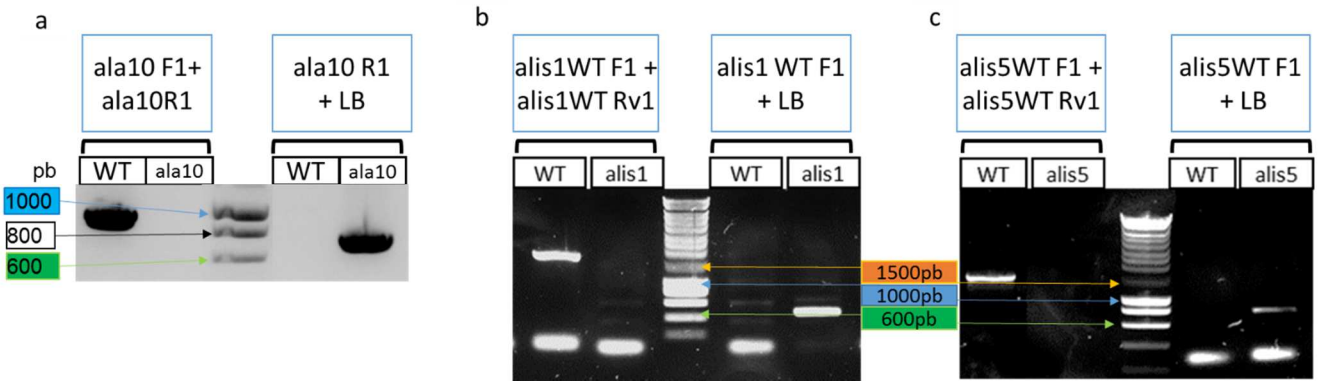


***Figure 24 : Génotypage des lignées KOala10 (a) KOalis1 (b) et KOalis5 (c**). Dans chaque cas le couple d'amorce utilisé est présenté dans les cadre bleu, à gauche amorce visant à amplifier le gène sauvage (WT), à droite les amorce visant à amplifier le l'ADNt. Les lignées dont l'ADNg, utilisé comme matrice, est extrait sont indiqué dans les cadres noirs.*

2. Techniques de clonage d'ADN en système procaryote

a. Souches bactériennes utilisées

La souche d'*Escherichia coli* DH5α été utilisée pour le clonage des gènes d'intérêt. Cette souche est déficiente pour le processus de recombinaison (*RecA*$^-$). Ces bactéries sont cultivées dans du milieu Luria-Broth (LB) 15 g/L en milieu gélosé (1 % agar) ou en milieu liquide à 37°C. Les bactéries utilisées pour les transformations sont rendues thermo-compétentes par des lavages successifs au $CaCl_2$. Elles sont ensuite conservées à -80°C après congélation dans de l'azote liquide.

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie pathogène pour les plantes supérieures qui induit une tumeur chez la plante parasitée. Elle possède un plasmide Ti, de 214 kb, permettant à la bactérie de transférer un fragment d'ADN-T qui contient des gènes induisant la tumeur chez la plante. Ce fragment d'ADN s'intègre de manière aléatoire dans le génome nucléaire de la cellule hôte. Les gènes portés par cet ADN-T peuvent être remplacés par des gènes d'intérêt, suivant les techniques classiques de biologie moléculaire. Cette bactérie a été utilisée pour construire les plantes transgéniques. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée est la souche GV3101::pMP90, résistante à la rifampicilline et à la gentamycine. La résistance à la gentamycine est portée par le plasmide Ti délété des gènes induisant une tumeur chez la plante. Les bactéries sont rendues thermo-compétentes par resuspension de la culture dans du TE pH8 à 4°C après centrifugation. Les agrobacterium sont cultivées dans du mililieu LB 15g/L en milieu gélosé (1 % agar) ou en milieu liquide à 28°C. Les bactéries sont rendues électrocompétentes par centrifugation et lavages successifs dans de l'eau. Elles sont ensuite congelées dans de l'azote liquide puis conservées dans du glycérol 10 % à -80°C.

b. Vecteurs d'expression utilisés et obtention des constructions

Le clonage des ADNc correspondant aux gènes d'intérêts a été effectué en utilisant comme matrice des ADNc issues de la rétrotranscription *in vitro* des ARN de plantules d'Arabidopsis cultivées 15 jours sur milieu solide en jours long comme décrit précédemment. Ces ADNc ont été gracieusement donnés par Denis Falconet.

Pour construire le vecteur d'expression d'ALA10-GFP chez Arabidopsis, après amplification par PCR, l'ADNc codant pour ALA10 a été cloné dans le plasmide pUC18 sous le contrôle du promoteur viral constitutif du virus de la mosaïque du chou-fleur, CaMV35S, en amont et en phase avec le gène GFP-S65T et avant le terminateur du gène de la nopaline synthase *nos*. Cette construction est ensuite insérée dans le vecteur binaire *E. coli*/*A. tumefaciens* pEL103 (créé par Eric Lam, Université du New

Jersey, USA). Ce vecteur est dérivé du plasmide Ti d'*A tumefaciens* ; il confère une résistance à la kanamycine à son hôte. Ce vecteur comporte entre les bords droit et gauche de l'ADN-T une construction destinée à l'expression de protéines chez les plantes, comprenant le promoteur CaMV35S, un activateur traductionnel Ω et le terminateur *nos*.

Pour construire les vecteurs d'expression pour le BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation), les ADNc des gènes codant pour ALA10, ALIS1 ALIS2, ALIS3, ALIS5, FAD2, FAD3, PUB11 et KLCR2 ont été amplifiés par PCR et clonés dans le vecteur pENTR:D/TOPO (Invitrogene). Ce vecteur permet le clonage directionnel de la séquence d'intérêt sans utilisation d'enzyme de restriction par utilisation d'une recombinaison médiée par une topoisomerase. Il contient un gène de résistance à la kanamycine et, de part et d'autre de la séquence recevant l'insert, des séquences Gateway « attL » et « attR » permettant la reconnaissance par la LR clonase issue du système Gateway (Invitrogene). Les ADNc sont ensuite insérés dans les vecteurs Gateway d'expression pFP1201 et pFP1204 gracieusement donnés par François Parcy. L'insertion se situe sous le contrôle d'un double promoteur CaMV35S, en amont et en phase avec l'une des parties Nter ou Cter de la protéine fluorescente jaune (YFP), suivie du terminateur *nos*. Ces vecteurs portent un gène de résistance à la spectinomycine.

La construction des vecteurs d'expressions ALIS1-CFP-HA et ALIS5-CFP-HA a été effectuée dans le vecteur p103 de la série des pEARLYgate à partir des clones pENTR:D/TOPO ALIS1 et ALIS 5 respectivement. Ce vecteur est aussi compatible avec la technologie Gateway et porte un gène de résistance à la kanamycine pour sélection en bactérie et un gène de résistance au BASTA pour sélection *in planta* (Earley et al., 2006).

c. Extraction de plasmides présents dans les bactéries

Les plasmides sont extraits par lyse alcaline des bactéries et purification sur colonne d'affinité à partir des kits de mini ou midi-préparations (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur.

d. Extraction de fragments d'ADN présents dans un gel d'agarose

Les fragments d'ADN issus d'une digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1% dans du TAE (composition) 0,5 X) contenant 0,01 % (v/v) de SybrSafe (marque). Les inserts sont localisés après une courte exposition sous ultra-violet et la bande d'agarose contenant le fragment à purifier est découpée. Le kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel) est utilisé pour extraire l'ADN de l'agarose en suivant les instructions du fournisseur.

e. Insertion des ADNc dans les vecteurs

Les ADNc des gènes d'intérêts sont d'abord amplifiés par PCR en utilisant une amorce forward ayant la séquence CACC en amont de l'ATG. Après purification du produit PCR sur colonne (kit Macherey-Nagel), 1µL (20ng) de vecteur pENTR:D/TOPO linéarisé est mélangé à une quantité molaire équivalente de produit PCR. 1 µl de solution saline 1,2M NaCl, 0,06M $MgCl_2$ est ajoutée et le volume est ajusté à 6 µl avec de l'eau. Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante de 5 à 15 min et 3µl sont utilisés pour transformer les E. Coli compétentes.

Pour les constructions utilisées en BiFC, une fois les séquences d'intérêts clonées dans le pENTR:D/TOPO, celles-ci sont insérées dans les vecteurs d'expression pFP1201 et pFP1204. Ce clonage est effectué en une étape : 150 ng de chaque plasmide sont mélangés avec 2µL de tampon LR clonase 5x et 1µL de LR clonase enzyme mix, le mélange réactionnel est complété avec du TE pour un volume final de 10µL. Le mélange réactionnel est incubé 1h à température ambiante. Enfin, 5µl de ce mélange sont utilisés pour transformer les bactéries.

Pour les constructions des vecteurs d'expressions ALIS1-CFP-HA et ALIS5-CFP-HA, le vecteur p103 porte comme le pENTR:D/TOPO la sélection par résistance à la kanamycine ce qui empêche d'utiliser le clonage Gateway directe comme précédemment. Pour contourner ce problème, les séquences codantes pour ALIS1 et ALIS5 sont amplifiées par PCR à partir des constructions dans pENTR:D/TOPO, les amorces choisies pour cette amplification se trouvent en amont et en aval des séquences attL et attR permettant l'utilisation de la LR clonase. Après purification des amplicons, ils sont insérés dans le p103 par la technique Gateway.

f. Transformation des bactéries

Les bactéries *E. coli* DH5α thermo-compétentes sont incubées sur glace pendant 30 min en présence de 10 à 50 ng de plasmide, puis elles sont incubées 30 s à 42°C avant transfert 2 min dans la glace afin de laisser pénétrer le plasmide dans la bactérie. La suspension bactérienne est ensuite incubée 1 h dans du milieu LB à 37°C. Afin de sélectionner les bactéries ayant intégré un plasmide, la suspension bactérienne est étalée sur boite de Pétri contenant du milieu LB gélosé et l'antibiotique dont le plasmide possède le gène de résistance. Elles sont cultivée à 37°C pendant 12 h pour permettre le développement des colonies.

Les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* thermo-compétentes sont transformées par ajout de 1µg de plasmide à un aliquot encore congelé, lequel est ensuite incubé 1 min à 39°C, les bactéries sont ensuite incubées 30min sur glace. 350µl de LB liquide est ajouté à la suspension qui est ensuite incubée 3h à 28°C pour permettre l'expression des protéines de résistance aux antibiotiques. Après incubation, la suspension est étalée sur boite de pétri contenant du LB gélosé et les antibiotiques dont la souche et les plasmides portent les résistances. Les boites sont incubées 48 à 72h à 28°C pour permettre le développement des colonies.

V. Expression de protéines fusionnées à la GFP

1. Obtention et transformation des protoplastes d'Arabidopsis

Les cellules végétales sont schématiquement constituées d'un protoplaste délimité par la membrane plasmique et entouré d'une paroi pecto-cellulosique. Les protoplastes présentent l'avantage de permettre l'expression transitoire des gènes d'intérêt dans des cellules chlorophylliennes. De plus, ce système permet une observation plus résolutive que celle sur tissus entier, du fait 1) de la moindre épaisseur des protoplastes par rapport aux tissus et 2) de l'élimination de la paroi, source d'autofluorescence. Cependant, les protoplastes sont extrêmement fragiles. Il est nécessaire d'utiliser des cônes dont l'extrémité est coupée pour en agrandir l'ouverture et minimiser ainsi l'éclatement des protoplastes lors des pipetages.

Les protoplastes sont obtenus en suivant un protocole adapté de celui de Yoo et al. 2017. Les plantes WT sont cultivées sur terre, en jours courts, pendant trois à cinq semaines. Une vingtaine de feuilles saines issues du centre de la rosette sont récoltées et coupées avec une lame de scalpel en bandes d'environ 1 mm de large. Les bandes sont rapidement infiltrées avec une solution enzymatique contenant 1,5 % (p/v) de cellulase R10 (Onozuka), 0,4 % (p/v) de macérozyme R10 (Onozuka), 0,4 M de mannitol, 20 mM de KCl, 20 mM de MES, 10 mM de $CaCl_2$ et 0,1 % (p/v) de BSA. Cette solution est préalablement équilibrée à pH 5,7 avec une solution concentrée de KOH puis filtrée avant utilisation. L'infiltration se fait au moyen d'une seringue de 20 mL : le piston est retiré, les bandes de feuilles sont déposées dans la seringue, le piston est remis en place puis 10mL de solution sont aspirés dans la seringue. Les bulles d'air sont éliminées, puis l'embout est bouché et le piston est délicatement tiré générant une dépression permettant une infiltration complète du tissu en quelques secondes.

L'infiltration est contrôlée par observation des échantillons qui apparaissent translucides lorsque la solution a remplacé l'air présent dans les tissus. Ensuite, 10 mL d'air sont aspirés permettant une oxygénation du milieu et le milieu est incubé pendant 4h à l'obscurité à température ambiante. Après incubation, l'air présent est éliminé et remplacé par 10 mL de solution W5 en vue de diminuer la viscosité du milieu. La solution W5 contient 5 mM de KCl, 125 mM de $CaCl_2$, 154 mM de NaCl et 2 mM de MES dont le pH est équilibré à 5,7 avec une solution concentrée de KOH. Les protoplastes sont ensuite filtrés sur un filtre de nylon stérile de largeur de maille de 40 µM afin d'éliminer les débris cellulaires. Les protoplastes sont récupérés dans un tube Falcon et laissés 20 min à sédimenter par gravité. Le surnageant est éliminé et les protoplastes sont repris dans un même volume de solution W5. 15 µL de suspension sont déposés sur une cellule de Mallassez pour comptage et vérification de l'intégrité des protoplastes. Le reste de la suspension est à nouveau laissé à sédimenter 15 min. Le surnageant est éliminé et les protoplastes sont repris dans une solution (MMG) à une concentration de 10^6cellules/mL. La solution MMG est composée de mannitol 0,4 M, MgCl2 15 mM, MES 2 mM dont le pH est équilibré à 5,7 avec une solution concentrée de KOH.

Pour chaque vecteur à transfecter, 100 µl de suspension (10^5 protoplastes) sont transférés dans un tube contenant 10 µl de vecteur à une concentration de 1 à 5 µg/µL. Après homogénéisation par inversion du tube, la transfection est effectuée par ajout de 110 µL d'une solution de PEG4000 30% (p/v), mannitol 0,2 M, $CaCl_2$ 100 mM. Ce mélange est incubé 15 min à température ambiante avec homogénéisation répétée par chiquenaude. La transfection est arrêtée par ajout de 440 µL de solution W5. Les protoplastes sont ensuite sédimentés par centrifugation douce à 100x*g* pendant une ou deux minutes et repris dans 1 mL de solution WI contenant du MES 4 mM, du mannitol 0,5M et du KCl 20 mM. Cette suspension est incubée de 16 à 24 h à température ambiante en plaques multipuits (épaisseur de solution dans les puits 1mm) afin de maximiser l'oxygénation.

2. Transformation et expression stable chez *Arabidopsis thaliana*

La transgénèse végétale utilise les propriétés du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, qui est capable de transférer un fragment d'ADN-T dans le génome de la plante. Après quatre semaines de culture, les plants d'Arabidopsis sont transformés en incubant leurs inflorescences de 5 à 45 s dans une solution de 5 % saccharose (p/v), 0,02 % (v/v) du surfactant Silwett L-77, dans laquelle des *Agrobacterium tumefaciens*, contenant les constructions d'intérêt, ont été remis en suspension (densité optique 0,8). Les graines sont ensuite récupérées après maturation et les plants transformés sont sélectionnés sur kanamycine 50 µg/mL en milieu MS (Murashige et Skoog, 1962 ; Duchefa), Agar 0,8%, saccharose 0,5 % (p/v) comme décrit plus haut.

VI. Analyse par microscopie

1. Microscopie confocale

Les observations en microscopie confocale à balayage laser ont été faites au moyen d'un objectif x 40à immersion à huile à température ambiante avec un système d'exploitation TCS-SP2 (Leica). Pour les localisations subcellulaires, l'excitation ainsi que la collection du signal de la CFP, GFP, BODIPY Tr Glibenclamide (marque), MitoTracker (marque), et de la chlorophylle sont faites séquentiellement, (400Hz, de deux à 8 stack de moyennage ligne par ligne). L'excitation est réalisée par les faisceaux 458 nm et 488 nm d'un laser argon pour la CFP et la GFP respectivement, du faisceau 543 nm d'un laser Helium-Neon pour le MitoTraker et le BODIPY et du faisceau 633 nm d'un laser Helium-Neon pour la chlorophylle. La fluorescence est collectée entre 465 et 480 nm, 505 et 514 nm, 580 et 615 nm, 553 et

607 nm, et 658 et 700 nm pour la CFP, la GFP, le BODIPY, le MitoTracker, et la chlorophylle, respectivement.

Pour les observations de BiFC, l'excitation de la YFP reconstituée et de la chlorophylle se font respectivement au moyen du faisceau 488 nm d'un laser Argon et du faisceau 633 nm d'un laser Helium-Neon et les fenêtres de collection s'étendent entre 522 nm et 532 nm pour la YFP et la chlorophylle respectivement. (moyennage de 8, ligne par ligne). Pour le XYλ scan, la fenêtre de collection s'étend sur 10nm avec un moyennage de 2, ligne par ligne).

2. Visualisation des structures membranaires subcellulaires par microscopie électronique en transmission

Un microscope électronique en transmission (MET) peut être comparé au microscope optique. Au lieu de la lumière visible (onde électromagnétique de longueur d'onde comprise entre 400 et 800 nm), un MET utilise des électrons hautement énergétiques (dont la longueur d'onde est de 1000 à 10000 fois plus petite que celle de la lumière) ce qui permet de visualiser des objets beaucoup plus petits qu'au microscope optique ($2x10^{-10}$ m au lieu de $2x10^{-7}$ m). Ainsi, dans une cellule visualisée par microscopie électronique en transmission, les membranes sont observables.

Les cellules d'*Arabidopsis* sont fixées pendant 16 h à 4°C dans 1 mL de tampon 0,1 M cacodylate de sodium, 1,5% glutaraldéhyde, à pH 6,9. Les cellules sont ensuite à nouveau fixées dans 1 mL de tampon 0,1 M cacodylate de sodium, 1% tetroxide d'osmium pendant 2 h. Après cette double fixation, les cellules sont déshydratées par une augmentation croissante de la concentration en éthanol jusqu'à l'éthanol pur et finalement incluses dans un mélange Epon-Araldite. Des sections fines sont coupées par un ultra-microtome (Ultracut, Reichert-Jung, Wien, Austria), et analysées au microscope électronique à transmission (Hitachi 300, Tokyo, Japan) à 75 kV.

3. Analyse des images de microscopie électronique par Image J

Les clichés de microscopie électronique permettent une observation très fine de l'ultrastructure des chloroplastes et, bien que certaines différences entre les lignées semblent évidentes, il est nécessaire de les quantifier et de procéder à une analyse statistique. Pour ce faire, les clichés ont été analysés à l'aide du logiciel ImageJ (NIH). Après détermination de l'échelle de chaque image, l'enveloppe des chloroplastes est sélectionnée manuellement. Le logiciel permet de calculer l'aire et le périmètre de la zone sélectionnée. Ensuite, afin de mesurer le développement des thylakoïdes, l'image est lissée (chaque pixel est pour réduire le bruit de fond puis les contrastes sont localement augmentés pour faire ressortir les thylakoïdes. Enfin, l'image est binarisée ce qui permet l'utilisation de l'outil « Analyse particule » permettant de déterminer automatiquement la surface de chacun des thylacoides. Mis à part la mise à l'échelle et la sélection de l'enveloppe des chloroplastes, le traitement des images a été automatisé par la création d'une macro (code en annexe).

VII. Analyse de lipides

1. Extraction selon Folch

50 mg de feuilles d'*Arabidopsis* ou 500 mg de cellules sont lyophylisées pendant la nuit. Le matériel végétal sec est broyé dans l'azote liquide puis transféré dans 4 mL d'éthanol bouillant pendant 5 min afin de bloquer l'action des lipases présentes dans l'échantillon (Folch et al., 1957). Après addition de 2 mL de méthanol et 10 mL de chloroforme, l'extrait est incubé 1 h à température ambiante. L'extrait est ensuite soumis à une filtration, une addition de 3 mL de chloroforme – méthanol (2/1 ; v/v) et 5 mL

de NaCl 1%, puis une centrifugation de 10 min à 3000 x *g*. La phase inférieure contenant les lipides est récupérée puis évaporée sous argon et les lipides sont stockés à –20°C à sec. Pendant l'ensemble de ces manipulations les suspensions sont maintenues sous argon pour éviter leur oxydation.

2. Séparation et dosage des lipides

La CCM repose sur des phénomènes d'adsorption différentielle : une phase mobile constituée de solvant progresse le long d'une phase stationnaire (silice) fixée sur une plaque de verre (Merck).

Les lipides sont séparés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice (silica gel 60, Merck). L'extrait lipidique contenant entre 250 µg et 1 mg de lipides est déposé sur la silice. Les solvants utilisés sont présentés Figure 25.

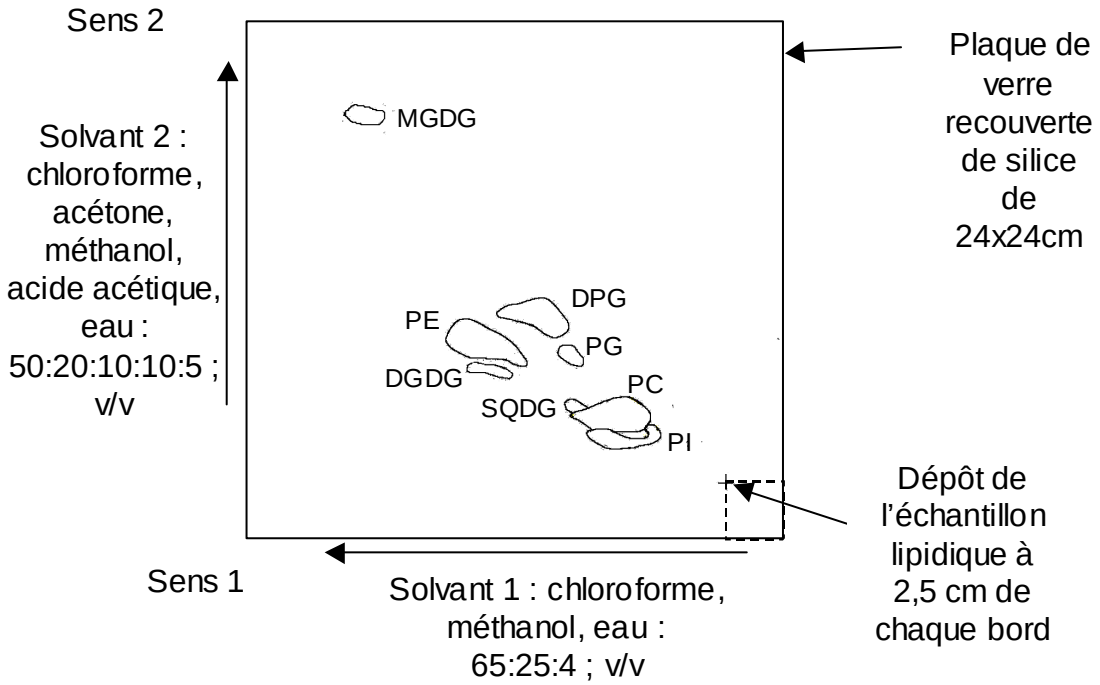


Figure 25 : Analyse de lipides par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (conditions d'après Douce et al., 1990)

Entre les deux sens de migration, les plaques sont conservées sous argon afin d'assurer le séchage de la couche mince de silice et d'éviter une mauvaise migration des lipides dans le deuxième sens. Après migration, les différents lipides sont visualisés soit sous lumière ultra-violette, après pulvérisation d'ANS (acide 8-anilino-1-naphtalène-sulfonique 0,2% (p/v) dans le méthanol. Les glycolipides peuvent être visualisés par une coloration violette des sucres réducteurs après pulvérisation d'α-naphtol (1 % β-naphtol, 5 % H_2SO_4 dans l'éthanol) et 3 min de chauffage à 110°C. Les lipides repérés par l'une de ces deux méthodes sont identifiés en comparant leurs caractéristiques de migration à celles de lipides témoins chromatographiés dans les mêmes conditions.

3. Chromatographie en phase gazeuse

Les esters méthylés d'acides gras à analyser sont repris dans 40 µL d'hexane et 2 µL est analysé par chromatographie en phase gazeuse (colonne de cyanopropyl polysilphène-siloxane (BPX70, SGE), détecteur par ionisation de flamme, gaz vecteur azote, température croissante de 130 à 180°C). Les différents acides gras sont identifiés en comparant les temps de rétention de leurs esters méthylés avec ceux de témoins ; ce temps dépend du nombre de carbone et du degré d'insaturation de la molécule considérée. La quantification des acides gras méthylés composant le mélange injecté est rendu possible par comparaison avec le signal du standard interne.

4. Spectrométrie de masse

25 nmol d'acide gras de l'extrait lipidique est resuspendu dans 100 µL de chloroforme/methanol (2/1, v/v) contenant 125 pmol de chaque standard interne (un standard par classe de lipide analysée). Les standards internes proviennent d'Avanti Polar Lipids Inc. pour la PC 18:0-18:0, PE 18:0-18:0, PI 18:0-18:0, PS 18:0-18:0, PG 18:0-18:0, AP 18:0-18:0, and CL 14:0-14:0-14:0-14:0, ou ont été synthétisé par D. Lafont pour le MGDG 18:0-8:0 et le DGDG 16:0-16:0 (Amara et al., 2010). Le SQDG 16:0-18:0 a été obtenu à partir de SQDG purifiés à partir d'un extrait lipidique d'épinard qui a ensuite été hydrogéné.

Les lipides ont ensuite été séparés par HPLC et quantifies par MS/MS. La méthode HPLC est adaptée de (Rainteau et al., 2012). Acyl chains of phospholipase D transphosphatidylation products in Arabidopsis cells: a study using multiple reaction monitoring mass spectrometry. PLoS One *7*, e41985.) Les classes lipidiques sont séparés en utilisant le système HPLC Agilent 1200 avec une colonne diol 5 µm, 150 mm x 3 mm (diamètre des billes, longueur x diamètre interne) (Macherey_Nagel). Les phases mobiles sont constitués du solvant A (hexane/isopropanol/eau/ acétate d'ammonium 1 M, pH 5,3 [625/350/24/1, (v/v/v/v)]) et du solvant B (isopropanol/ eau/ acétate d'ammonium 1M, pH 5,3 [850/149/1, (v/v/v)]. Le volume d'injection est de 20 µL (soit 5 nmol d'acide gras totaux et 25 pmol de chaque standard interne). Après 5 min, le pourcentage de B est augmenté linéairement de 0 à 100 % pendant 30 min et reste à 100% pendant 15 min. Cette séquence d'élution est suivi par un retour à 100 % de solvant A en 5 min suivi d'une équilibration pendant 20 min en 100 % de A avant l'injection suivante conduisant à un temps total de 70 min. Le débit de la phase mobile est de 200 µL/min et la température est maintenue à 40°C. Les différentes classes de glycérolipides sont ainsi élués en fonction de leur tête polaire.

L'analyse par spectrométrie de masse est réalisée sur un triple quadrupole 6460 (Agilent) équipé d'une source Jet stream electrospray (ESI) avec les paramètres suivants : Drying gas heater: 260°C, Drying gas flow 13 L/min, Sheath gas heater: 300°C, Sheath gas flow: 11 L/min, Nebulizer pressure: 25 psi, Capillary voltage: ± 5000 V, Nozzle voltage ± 1000.

L'azote est utilisé comme gaz de collision. Les quadrupoles Q1 et Q3 sont utilisés aux résolutions widest et unit respectivement. L'analyse de la PC est réalisée en mode positif en scannant un précurseur de m/z 184 à une énergie de collision (CE) de 34 eV. Le SQDG est réalisé en mode négatif en scannant un précurseur de m/z 225 à une énergie de collision (CE) de _56 eV. Les mesures de PE, PI, PS, PG, AP, MGDG et DGDG sont réalisés en mode positif en scannant pour une perte de masse neutre de 141 Da, 277 Da, 185 Da, 189 Da, 115 Da, 179 Da et 341 Da à des CEs de 20 eV, 12 eV, 20 eV, 16 eV, 16 eV, 8 eV et 8 eV respectivement. Les quantifications sont réalisées par multiple reaction monitoring (MRM) avec 25 ms de dwell time. Les espèces de CL ont été quantifiés par MRM en mode négatif comme les ions simplement chargés [M-H]-, perdant une molécule de AP à une CE de -45 eV avec un dwell time de 50 ms. Les espèces de DAG et TAG ont été quantifiés par MRM en mode positif comme les ions simplement chargés [M+NH4]+, perdant un acide gras à une CE de 12 eV avec un dwell time de 25 ms. Les spectres de masses acquis sont ensuite traités avec le logiciel MassHunter Workstation (Agilent) pour l'identifiaction et la quantification des lipides. La quantité de lipides en pmol est corrigée par les différences de réponses entre les standards internes et les lipides endogènes.

VIII. Analyse des protéines

1. Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée selon deux méthodes : la technique de (Lowry *et al.,* 1951) pour la majorité des échantillons et la méthode de (Bradford, 1976) pour les échantillons

contenant du dithiotreitol. Dans les deux cas, le dosage s'effectue par comparaison avec une gamme étalon réalisée pour chaque série de dosages avec la SAB (Sérum Albumine Bovine).

2. Analyse des protéines par électrophorèse

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) permet de séparer les polypeptides en fonction de leur poids moléculaire. Les échantillons sont repris dans du tampon de dépôt (Tris-HCl 50 mM, saccharose 10 % (m/v), SDS 2 % (m/v), Bleu de bromophénol 0,01 % (m/v), DTT 25 mM, pH 6,8) pour obtenir les concentrations protéiques voulues.

Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de concentration contenant 5% (v/v) d'acrylamide et d'un gel de séparation contenant 12 % (v/v) d'acrylamide. L'électrophorèse est conduite à voltage constant (120 V) dans du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,2 %, pH 8,3). Après électrophorèse, les protéines peuvent être soit transférées sur membrane de nitrocellulose pour permettre un immuno-marquage avec un anticorps spécifique, soit colorées au bleu de Coomassie. Le gel est alors incubé pendant 1 h dans du milieu de coloration (bleu de Coomassie R250 5 g/L, isopropanol 25 % (v/v), acide acétique 10 % (v/v). L'excès de colorant est ensuite enlevé par des lavages successifs dans du décolorant (isopropanol 25 %, acide acétique 10 %).

3. Electro-transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les polypeptides séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes sont transférés électriquement sur une membrane de nitrocellulose de 0,18 µm (Schleicher et Schuell). Après équilibration du gel à deux reprises pendant 5 min dans du tampon de transfert (Tris-HCl 21 mM, glycine 160 mM, pH 8,3, éthanol 17 %), le transfert est effectué durant 1 h à 4°C sous voltage constant (90V) dans le tampon de transfert complété avec du SDS 0,1 % (v/v). La membrane de nitrocellulose est rincée à l'eau à deux reprises pendant 5 min. L'efficacité du transfert et la position des marqueurs de poids moléculaire (Amersham) sont vérifiées par coloration des protéines au rouge ponceau 0, 2% (m/v) dans TCA 3 % (v/v).

4. Immuno-marquage

Après électro-transfert, la membrane de nitrocellulose est rincée dans de l'eau distillée puis saturée en protéines dans un tampon de TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 9 g/L, pH 7,5) contenant 5 % (p/v) de lait écrémé déshydraté pendant 1h sous agitation à température ambiante. La membrane est ensuite incubée à 4°C pendant 16 h dans une solution de TBS-lait 5 %, contenant l'anticorps primaire spécifique de la protéine à détecter. Les anticorps primaires sont utilisés aux concentrations suivantes : H^+-ATPase (plasma membrane) au 1/1,000, V-ATPase (membrane du tonoplaste) 1/2,000, BIP2 (RE) 1/5,000, COXII (Membrane interne mitochondriale) 1/2,000, SEC21 (Golgi) 1/1,000. Serum anti-KARI (plastidiale ketol-acid reductoisomerase) utilisé au 1/10,000 comme dans (Yamaryo et al., 2008). La fixation non spécifique de l'anticorps est éliminée par trois lavages successifs de 10 min de la membrane dans un tampon de TBS-tween 0,1 % (p/v). La membrane est ensuite incubée 1 h dans du TBS-lait 5% contenant l'anticorps secondaire dilué au 1/10000ème. Cet anticorps secondaire, anti-lapin, est couplé à une peroxydase (Amersham).

Après incubation en présence du deuxième anticorps, la membrane est lavée à deux reprises pendant 10 min dans un tampon de TBS-tween 0,1 % et une fois pendant 10 min dans un tampon TBS. Le complexe protéine/anticorps primaire/anticorps secondaire est révélé à l'aide de luminol, substrat chemiluminescent de la peroxydase. La réaction chemiluminescente se traduit par une émission de lumière bleue après clivage du luminol. La réaction est réalisée à l'aide du kit ECL (Amersham) suivant

les instructions du fournisseur. Un film autoradiographique sensible à la lumière émise (Hyperfilm ECL, Amersham) est appliqué contre la membrane pendant des temps d'exposition variable (de 30s à 10 min) puis est développé. Le temps d'exposition est ajusté pour permettre l'obtention d'un signal non saturant.

5. Immunopurification (IP) sur colonne MACS4

Pour l'immunopurification sur billes couplées à l'anticorps anti-GFP, 300µg de protéines membranaires sont solubilisées dans 750µL de tampon de solubilisation contenant NaCl 50mM et Triton 100X 1% (v/v). Les échantillons sont incubés 30min dans la glace puis centrifugés à 100 000xg pendant 20min à 4°C pour éliminer la fraction membranaire non solubilisée. Le surnageant est incubé avec 50µL de billes magnétiques µMACS couplées à l'anti-GFP (Miltenyi Biotech) pour permettre la reconnaissance de l'antigène. Le mélange est incubé deux heures dans la glace, avant dépôt sur une colonne MACS placée sur un support magnétique retenant les billes. La colonne est ensuite lavée cinq fois avec 500µL de tampon de lavage contenant NaCl 50mM et de Triton 100X 0,1% (v/v). Les protéines sont éluées avec 75µL de tampon d'élution (µMACS, Miltenyi Biotech) (Tris HCl PH 50mM 6.8, DTT 50mM, SDS 1% (v/v), EDTA 1 mM, Bleu de bromophénol 0.005%, 10% glycérol) contenant des détergents qui vont décrocher les protéines, chauffé à 95°C dans un bain marie à sec pendant 5min. Un échantillon de 20µL est analysé sur gel.

6. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et Western Blot

Les protéines sont séparées et analysées par SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) à 10% ou à gradient 4-20% d'acrylamide à 80V ou 100V pendant 2 à 4h dans du tampon de charge Laemmli 1X (Tris-base 0,25M, Glycine 2M) contenant 0,2% SDS. Transfert semi-sec des protéines du gel sur la membrane de nitrocellulose est réalisé avec la solution de transfert TransBlot Uilisé selon les instructions du fabricant (BioRad), pendant 25 min à 20V. Les protéines sont ensuite colorées au Rouge Ponceau sur la membrane avant décoloration dans l'eau.

7. Immunomarquage des protéines lors des immunopurifications

La membrane de nitrocellulose est lavée avec 10mL de tampon de lavage TBS (Tris-Buffer saline) (Tris 20mM pH 7,4, NaCl 150mM) pendant 10min, avant la saturation des sites de fixation non spécifiques dans 10mL de TBS lait 5% (p/v) pendant 1h. La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C sous agitation avec 1ml de TBS lait 5% (p/v) contenant 10µL d'anticorps primaire anti-ALA10 de lapin dilué au 100ème. Les anticorps non fixés sont éliminés par deux lavages avec 10mL de TBS-tween 0,1%, dont le surplus est enlevé par 20mL de TBS-tween 0,01% (v/v). La membrane est ensuite incubée pendant 1h avec 20mL de TBS Tween 0,01% (v/v) contenant l'anticorps IIaire de lapin couplé à une enzyme peroxydase du radis noir (HRP). Après deux lavages de 5min de 10mL de TBS-tween 0,01% (v/v) et l'élimination du surplus par un lavage de 5min de 10mL de TBS, la membrane est incubée avec une solution de peroxyde d'hydrogène (Tris 50mM PH 8,5, acide P Coumaric 0,20mM, hydrogen peroxyde 3%) et de luminol (Tris 50mM pH 8,5, Luminol 3- 5Aminophalhydrazine 1,3mM) (ratio volume 1:1). La catalyse du peroxyde par HRP va induire l'oxydation du luminol en produisant une lumière, détectée par le Chemidoc. Le marquage anticorps anti-ubiquitine est réalisé de la même manière mais le blocage est réalisé dans du TBS-tween 1,5% (v/v) au lieu du TBS lait 5% (p/v). Pour le marquage à l'anticorps anti-GFP, la membrane est également saturée avec 10mL de TBS-tween 1,5% (v/v), avant incubation 10mL de TBS-tween 0,05% (v/v) contenant l'anticorps anti-GFP de souris dilué au 5000ème toute la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 10min avec 10mL de TBS-tween 0,05% (v/v), la révélation au Chemidoc est

réalisée comme précédemment. L'anticorps anti-ALA10 est un anticorps polyclonal de lapin préparé contre un peptide de 19 acides aminés aux positions 772 et 790 de la séquence d'ALA10. L'anticorps anti-ubiquitine est un anticorps polyclonal de lapin commercial (Millipore AB1690). L'anticorps anti-GFP est un anticorps de souris du commerce (Miltenyi Biotech) directement couplé à la peroxydase. L'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre anti-lapin commercial couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch).

IX. Analyse statistique

Les analyses stastitiques ont été faites soit en utilisant un test parametrique T-test de Student lorsque le nombre de réplicas et la nature des variable le permet, l'orsque le nombre de réplicats ou la nature des variable ne le permet pas nous avons appliqué des tests et des représentations non parametrique: (Wilcoxon ou Mann and Whithney) en Fonction de la nature des variables.

Chapitre I

ALA10 et l'homéostasie lipidique chez *Arabidopsis thaliana*

Comme nous l'avons développé en introduction, ALA10 apparait comme étant un candidat de choix dans la recherche d'acteur de l'homéostasie lipidique. Le fait qu'elle soit une ATPase de type P_4 et que son expression augmente en réponse à des modifications de la synthèse des galactolipides nous amène à émettre l'hypothèse qu'ALA10 serait un acteur de la régulation des voies de synthèse des galactolipides.

1. Analyse de la localisation de ALA10

a. Analyse de la séquence

Pour étudier le rôle d'ALA10, et mieux appréhender sa fonction, nous avons voulu déterminer sa localisation subcellulaire. En effet, déterminer le compartiment dans lequel elle agit permet d'appréhender sa position métabolique sachant que les différentes voies de synthèses des lipides sont localisées dans différents compartiments subcellulaires. Dans un premier temps, nous avons analysé in silico la séquence protéique d'ALA10 à la recherche d'un transit peptide qui pourrait indiquer sa localisation. Pour ce faire nous avons utilisé la base de données Sub Cellular Proteomic database (SUBA3) (Tanz et al., 2013), ainsi que la base de donnée TargetP1.1 (Emanuelsson et al., 2000) qui permet l'analyse *in silico* des protéines par homologie de séquence. Cette analyse prédit en Nter de la séquence de la protéine ALA10 la présence d'un transit peptide et de ce fait une possible distribution à la mitochondrie ou au chloroplaste (Figure 26).

Prot	Séquence fragment cytosolique Nter	Tf	Ttot	Ctp	Mtp	SP	Au	Loc	IR
ALA1	mdprksidkpphhdpilgvssrwsvsskdnkevtFGDLgskRIRHGSAGADSEMLSMSQKEIKDED----------ARLIYINDPDRTNE--RFEFTGNSIKTAKYSVFTFL	100	1158	0,267	0,105	0,092	0,838	-	3
ALA2	----------MKRFVYINDDEASKE----LCCDNRISNRKYTLWNFL	33	1107	0,069	0,088	0,076	0,892	-	1
ALA3	----------MVRSgs----FSVDSSATHQRTPSRTVTLGHIQPq---APTY-RTVYCNDRESNQP---VRFKGNSISTTKYNVFTFL	67	1213	0,156	0,583	0,006	0,255	*	4
ALA4	----------MARG---RIRSKLRLSHIYTFGCLRPSADEGQDPhpIQGPGFSRTVYCNQPHMHKK-KPLKYRSNYVSTTRYNLITFF	74	1216	0,052	0,714	0,043	0,198	*	3
ALA5	----------MARG---RIRSKLRLSLLYTFGCLRPATLEGQDSqpIQGPGFSRTVFCNQPHMHKK-KPLRYRSNYVSTTRYNLITFF	74	1228	0,038	0,751	0,049	0,060	*	2
ALA6	----------MARR---RIRSRIRKSHFYTFRCLRPKTLDDQGPhvINGPGYTRIVHCNQPHLHLAtKLIRYRSNYVSTTRYNLLTFL	75	1240	0,062	0,802	0,012	0,0169	M	2
ALA7	----------MGRR---RIRSRIRKSHFYTFKCLRPKTLEDQGPhiINGPGYTRIVHCNQPHLHLA-KVLRYTSNYVSTTRYNLITFL	74	1243	0,072	0,741	0,014	0,198	*	3
ALA8	----------MAGE----RRKGMKFSKLYSFKCFKPFSREDHSQ--IGSRGYSRVVFCNDPDNPEA-LQLNYRGNYVSTTKYTAANFI	71	1189	0,034	0,575	0,048	0,512	*	5
ALA9	----------MVGGgtkRRRRRLQLSKLYTLTCAQACFKQDHSQ--IGGPGFSRVVYCNEPDSPEA-DSRNYSDNYVRTTKYTLATFL	75	1200	0,006	0,920	0,033	0,237	M	2
ALA10	----------MAGPs---RRRRRLHLSKTYSYTCGKSSFQEDHSN--IGGPGFSRVVYCNEPGSPAA-ERRNYAGNYVRSTKYTVASFF	73	1202	0,059	0,801	0,019	0,156	M	2
ALA11	----------MTKC----RRRRLHLSNIYAFKGRKSNFQEDHSH--IGGPGFSRVVYCNEPNSPAA-ERRNYVGNYVRSTKYTLASFI	71	1203	0,014	0,876	0,014	0,272	M	2
ALA12	----------MATVsgrRRKRKIQLSKLFTLTGAKACFKPDHSK--IGRSGFSRVVFCNQPDSPEA-ESRNYCDNYVRTTKYTLATFL	75	1184	0,076	0,871	0,011	0,143	M	2

Figure 26 : Alignement des fragments cytosoliques Nter et prédiction bio-informatique de l'adressage des ALA. *Les acides aminés en rouge sont les plus conservés, en bleu ceux présentant une forte similarité, en gris ceux pour lesquels il y a une délétion à la position correspondante dans au moins deux autres ALA, alignement obtenue à l'aide du programme COBALT (Papadopoulos and Agarwala, 2007). Prédiction d'adressage obtenue avec TargetP1.1, les scores associés à la localisation chloroplastique (Ctp), mitochondriale (Mtp), voie sécrétrice (SP), ou autre (Au) ne correspondent pas à des probabilités, les scores de chaque localisation additionnés ne donnant pas 1, les scores les plus élevés sont ceux pour la localisation la plus probable. Loc: localisation prédite en fonction des scores obtenus M: mitochondriale, - autre que mitochondrie, chloroplaste, ou voie sécrétrice et * indique une prédiction trop peu fiable pour être déterminée, IR: indice de reliabilité: indice prenant en compte la différence entre les deux meilleurs score, un indice de 1 représente une forte reliabilité, un indice de 5 une faible différence de score entre les deux meilleurs prédictions. Tf: taille en acide aminé du fragment Cter aligné déterminé sur (http://www.uniprot.org/), Ttot: taille en acides aminés de la protéine totale.*

b. Fractionnement subcellulaire

Par ailleurs (Mitra et al., 2009), ont identifié la présence d'ALA10 au sein de la membrane plasmique lors de l'analyse du protéome de celle-ci. Ces données semblant contradictoires, nous avons voulu déterminer la localisation d'ALA10 par immunodétection sur des subfractions cellulaires. Nous avons réalisé un fractionnement cellulaire à partir de culture cellulaire. Pour chacune des fractions obtenues par centrifugation différentielle (voir Matériel et méthodes section V), l'enrichissement en chacun des compartiments attendu a été vérifié par immunodétection de protéines connues pour être spécifiques de ce compartiment: BIP2 (RE), H+ATPase (membrane plasmique), V-ATPase (tonoplaste), SEC21 (appareil de Golgi), COXII (membrane mitochondriale interne), OEP21 (membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste), IEP21 (membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste) et une ketol-acid reductoisomerase (KARI) pour le stroma du chloroplaste (Figure 27). On peut voir que le marqueur

mitochondrial est principalement présent dans la fraction mitochondriale (Mito), avec un léger signal dans les membranes légères, de même le marqueur du stroma chloroplastique est principalement présent dans les membranes lourdes avec un signal plus faible dans la fraction mitochondriale et le surnageant. Ces contaminations croisées montrent la limite de cette technique concernant l'isolement des compartiments subcellulaires. Cependant cette expérience montre que le signal correspondant à ALA10 est principalement présent dans la fraction membranes légères qui est enrichie en endomembranes (RE, Golgi, membrane plasmique) ainsi qu'en enveloppe du chloroplaste (Figure 27). Cette technique ne permettant pas de déterminer avec précision dans lequel de ces compartiments ALA10 est présente nous avons voulu déterminer sa localisation par imagerie confocale en utilisant une protéine chimérique ALA10-GFP. Or, cette technique requiert que la protéine chimérique soit exprimée fortement. Et comme nous l'avons vu en introduction, les ATPases de type P_4 nécessitent une interaction avec une sous unité β pour leur localisation. Nous avons donc voulu dans un premier temps savoir avec quelle ALIS, ALA10 interagit et si sa localisation dépend de cette interaction.

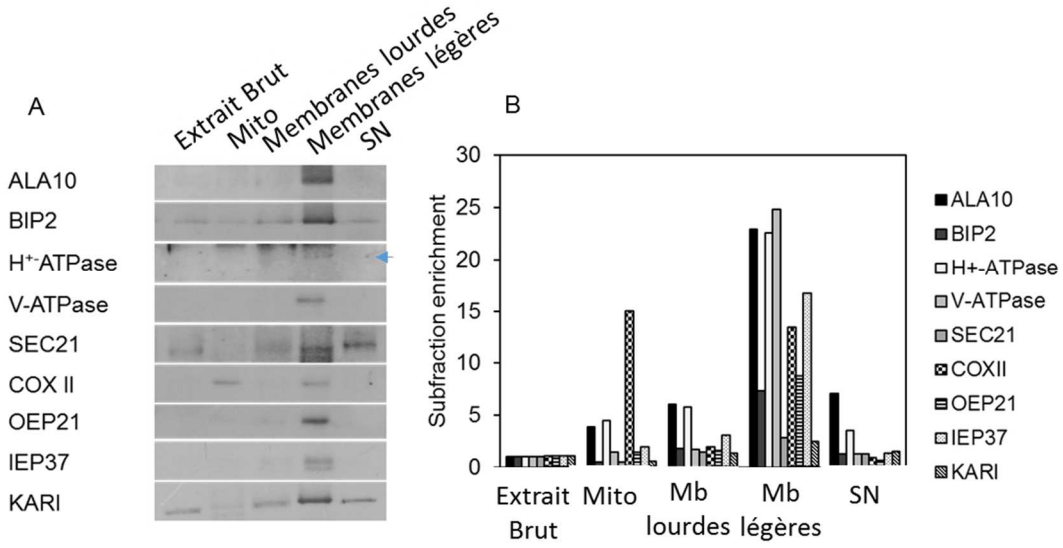


Figure 27 : Analyse de la localisation sub cellulaire d'ALA10 et des ALIS. A. *Immunodétection d'ALA10 dans des fractions sub cellulaires d'Arabidopsis. La pureté des fractions est vérifiée avec des anticorps marquants spécifiquement les différents compartiments: BIP2 (RE), H+ATPase (membrane plasmique), V-ATPase (Tonoplaste), Sec21 (Golgi), COXII (membrane interne de la mitochondrie), OEP21 (membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste), IEP37(membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste), et KARI (stroma du chloroplaste). La flèche bleue indique la taille attendue pour H+ATPase. La membrane interne de la mitochondrie est principalement détectée dans la fraction mito, avec un léger signal dans les membranes légères, la fraction correspondant au stroma est détectée principalement dans les «heavy membranes» avec des signaux additionnels dans les fractions Mito et SN (surnageant). B. Analyse de l'enrichissement spécifique de chaque fraction subcellulaire. Analyse de l'intensité des bandes réalisée avec le logiciel Image J. L'enrichissement relatif de chaque protéine dans les différentes fractions est calculé en normalisant l'intensité des signaux des différentes fractions par le signal obtenu dans l'extrait brut pour la protéine correspondante. Mito: fraction mitochondriale, SN: surnageant.*

c. Analyse des interactions ALA10-ALIS par BiFC

Comme nous l'avons développé en introduction, chez *Arabidopsis*, il y a cinq sous unité ALIS et ALIS1, ALIS3 et ALIS5 ont été montrées par (Lopez-Marques et al., 2010; Poulsen et al., 2008), comme étant nécessaire à ALA1, ALA2 et à ALA3 pour leur sortie du réticulum endoplasmique. Nous avons voulu déterminer s'il y avait une spécificité d'interaction entre ALA10 et les différentes ALIS. Dans ce but, nous avons réalisé un essai de complémentation de florescence biomoléculaire qui est une technique basée sur le fait que la protéine fluorescente jaune (YFP), lorsqu'elle est exprimée sous forme de deux peptides indépendants, a la capacité de reconstituer un fluorophore fonctionnel lorsque les deux peptides se trouvent à une distance inférieure à 7nm (Morell et al., 2007). Cet essai a donc consisté en

la coexpression transitoire en protoplastes des différentes protéines d'intérêts fusionnées en Cter avec les parties Cter ou Nter de la YFP. Nous avons fait le choix de ce système d'expression car celui-ci présente, d'une part l'avantage d'être rapide comparé à la transformation stable des plantes, d'autre part, cela permet l'expression des transgènes dans des cellules chlorophylliennes, ce qui n'est pas le cas de l'expression transitoire en épiderme d'oignon ou en épiderme de Tabac. Or au vue du lien entre ALA10 et l'homéostasie des galactolipides, la présence de chloroplastes fonctionnels au sein des cellules observées nous a semblé nécessaire.

Le clonage des séquences codantes pour ALA10 et les ALIS s'est fait à partir d'une banque d'ADNc de plantule d'une dizaine de jours gracieusement offerte par Denis Falconet. A partir de cette banque d'ADNc, il s'est avéré impossible de cloner la séquence codante pour ALIS4. Pour savoir si ce gène est réellement exprimé *in planta*, nous avons analysé les bases de données transcriptomiques disponible sur internet: EFP browser, TAIR (Winter et al., 2007). Selon les principales bases de données transcriptomiques d'*Arabidopsis*, ce gène n'est pas ou très faiblement exprimé dans toutes les conditions testées. Du fait des difficultés et des doutes sur l'expression d'ALIS4, nous n'avons pas poursuivi le travail sur cette protéine et nous avons travaillé uniquement sur les 4 autres ALIS.

L'analyse par BiFC a été effectuée par transfection de protoplastes de feuilles d'*Arabidopsis* âgées de 3 à 5 semaines, avec les plasmides permettant l'expression de chacune des protéines recombinantes (Matériel et méthodes section III.A). L'intensité des signaux YFP obtenus étant faible, nous avons vérifié les spectres d'émission chaque fois qu'un signal positif a été observé de façon à éliminer les faux positifs. Nous avons testé l'interaction de chacune des ALIS contre ALA10 dans les deux orientations de la YFP, mais aussi l'interaction de chacune des protéines avec elle-même. Dans ces conditions, les seules combinaisons où nous avons obtenu un signal YFP significatif sont celles concernant l'interaction ALA10/ALIS1 et ALA10/ALIS5 dans les deux orientations de la YFP (Figure 28). Dans nos conditions, aucun signal positif n'a pu être obtenu pour les autres combinaisons : au minimum 50 observations indépendantes ont été réalisées sur au minimum trois expériences indépendantes avec un taux de transfection du plasmide contrôle supérieur à 50%.

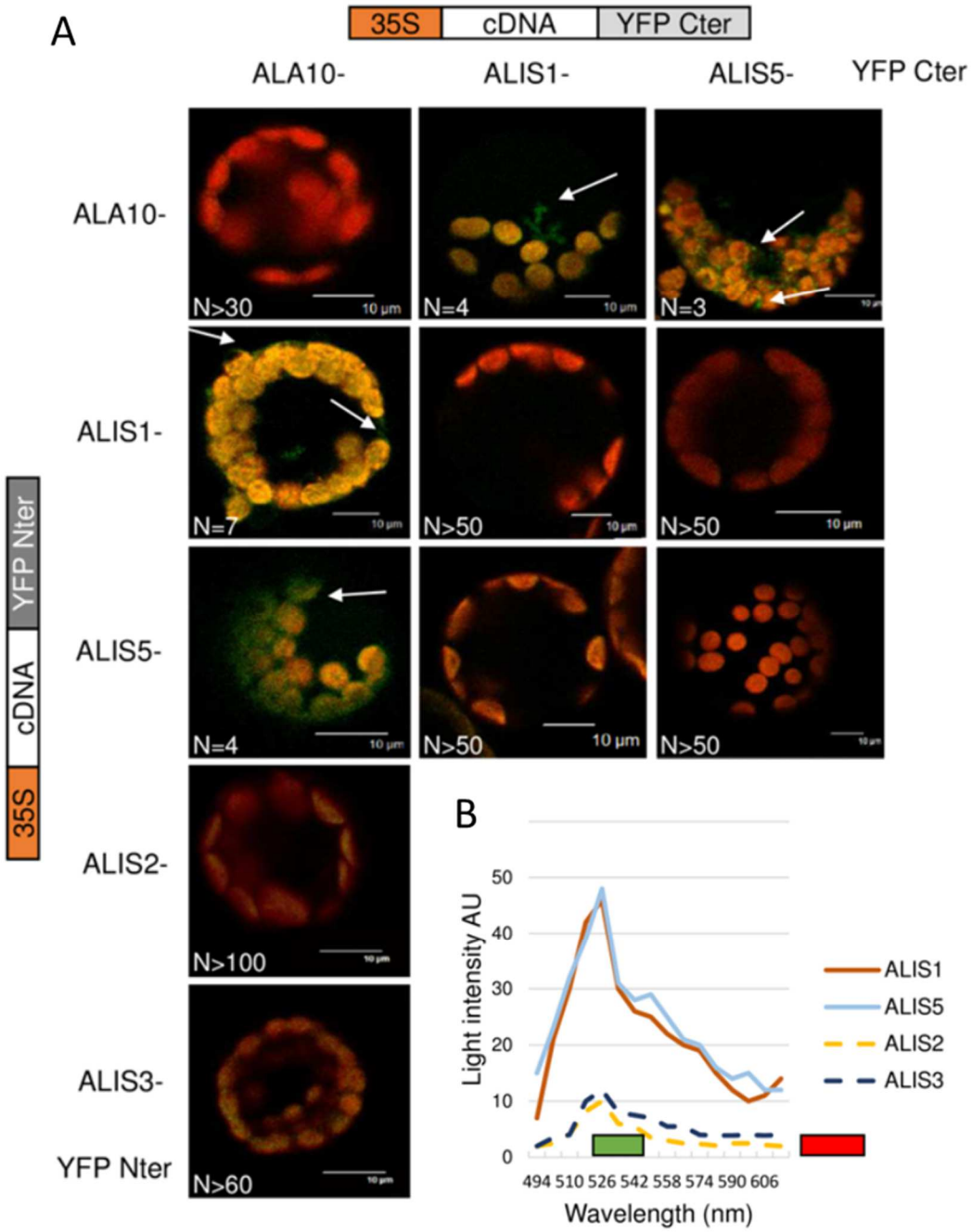


Figure 28 : Analyse des interactions ALA10/ALIS par BiFC. *A : Observation en microscopie confocale de protoplastes 16 à 24 h après transfection avec les constructions indiquées par les bandeaux tricolores à gauche et en haut. Superposition de la fluorescence de la YFP reconstituée en vert avec la fluorescence de la chlorophylle en rouge. B : Spectre d'émission représentatif des signaux obtenus avec les différentes ALIS contre ALA10 exprimées en unités arbitraires, intensités lumineuses normalisées par le nombre de pixels de la zone analysé. Le rectangle vert en abscisse situe le maximum d'émission théorique de la YFP, en rouge l'autofluorescence de la chlorophylle. Barre d'échelle = 10µm, N: nombre d'observations similaires obtenues indépendamment*

Au cours de ces observations, nous avons remarqué que la localisation du signal YFP était différente en fonction de la combinaison testée (Figure 28). Pour l'interaction avec ALIS1, nous avons observé une localisation à proximité directe de la membrane plasmique dans ce qui semble être le RE, le signal YFP étant particulièrement prononcé avec la combinaison ALA10-YFP Nter + ALIS1-YFP Cter. Alors que pour les combinaisons ALA10 avec ALIS5, le signal est localisé dans ce qui semble être le RE à proximité

directe du chloroplaste et est absent dans la zone proche de la membrane plasmique (Figure 29). Cependant la technique du BiFC, du fait que la reconstitution du fluorophore n'est pas réversible, peut aboutir à des artefacts de localisation (Kodama and Hu, 2012). En effet en dépit de la présence d'un linker entre les protéines d'intérêts et les fragments du fluorophores, il se pourrait que la reconstitution de la YFP puisse engendrer une mauvaise conformation du complexe qui pourrait entrainer une mauvaise localisation. Nous avons donc voulu confirmer ces résultats qui indiquent que la localisation d'ALA10 est dépendante de l'ALIS avec laquelle elle interagit.

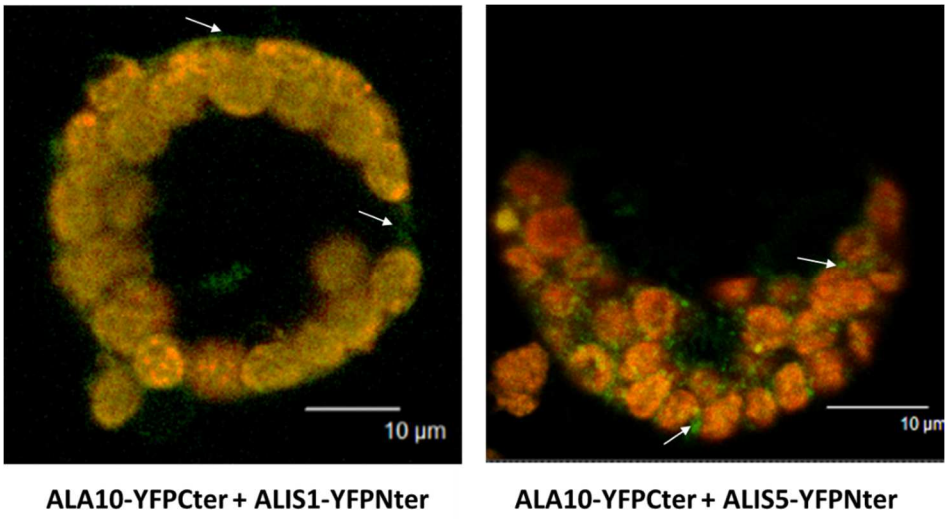


Figure 29 : Agrandissement des images obtenues ALA10-YFPCter coexprimée avec ALIS1-YFPNter ou ALIS5-YFPNter. *Agrandissement des images représentatives des interactions en BiFC d'ALA10 avec ALIS 1 et ALIS5 présentés figure 28, les flèches blanches présentent les localisations qui semblent dépendantes de l'ALIS surexprimée: à proximité de la membrane plasmique pour ALA10 avec ALIS1 ou à proximité directe des chloroplastes pour ALA10 avec ALIS5.*

d. ALA10, une localisation différentielle fonction du niveau d'expression de ALIS1 et ALIS5

Pour étudier la localisation de ALA10, nous avons dans un premier temps exprimé ALA10-GFP, ALIS1-CFP et ALIS5-CFP seules ou en combinaison dans des protoplastes de feuilles d'*Arabidopsis* WT de 4 semaines. Lorsqu'elles sont exprimées seules, les signaux GFP et CFP présentent une localisation typique de l'ensemble du RE (Figure 30A). En revanche, quand ALA10 est exprimée avec ALIS1 le signal de colocalisation se trouve fortement enrichie au niveau de la membrane plasmique, et dans une moindre mesure dans ce qui semble être du RE à proximité de la membrane plasmique (Figure 30B). Quand ALA10 est exprimée avec ALIS5, les signaux CFP et GFP sont observés dans le RE et on observe une forte augmentation du signal de colocalisation à proximité des chloroplastes (Figure 30B). Dans le cas de l'interaction d'ALA10 avec ALIS5 nous avons vérifié que la colocalisation avait bien lieu dans le RE grâce à une sonde fluorescente, le *bodipy-glibenclamide*, qui est un marqueur spécifique du RE (Figure 31). Ainsi il apparait que dans les protoplastes de feuilles, ALA10-GFP est localisée dans le RE et lorsqu'elle est exprimée avec ALIS5-CFP, le complexe est aussi localisé au niveau du RE, mais de façon préférentielle à proximité directe des chloroplastes.

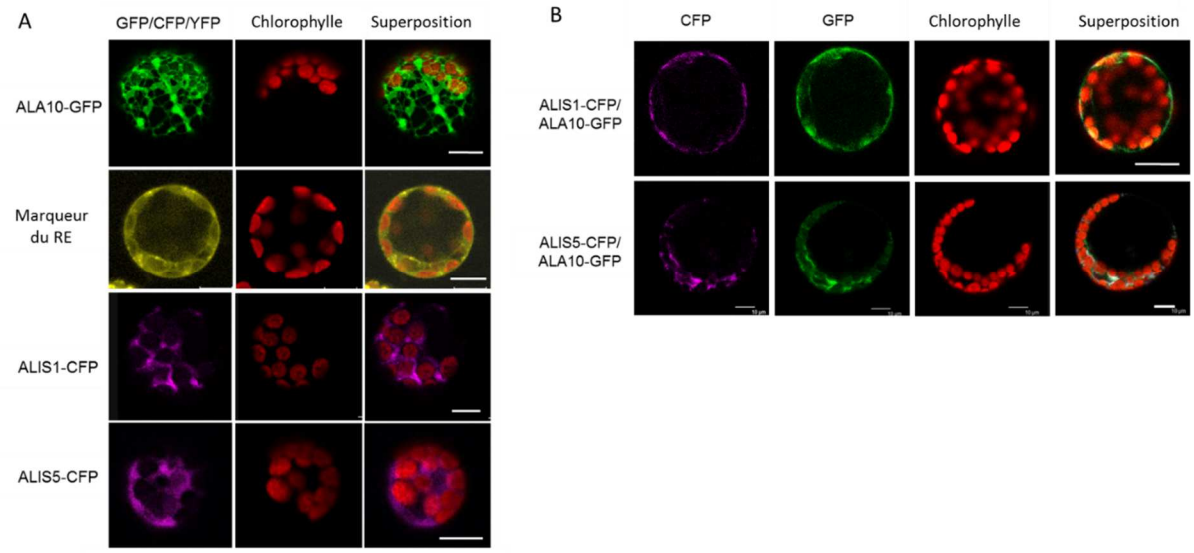


Figure 30 : Localisation d'ALA10-GFP, ALIS1-CFP et ALIS5-CFP en protoplaste*. A. Images obtenues par microscopie confocale de protoplastes transfectés avec pUC19:ALA10-GFP ou p102:ALIS1-CFP ou p102-ALIS5-CFP (respectivement lignes 1,3 et 4) ou après 40 minutes d'incubation avec un marqueur du RE: BODIPY TR Glibenclamide (2eme ligne). B. Colocalisation ALA10-GFP/ALIS1-CFP et ALA10-GFP/ALIS5-CFP en protoplaste Image obtenue comme précédemment sur protoplastes cotransfectés avec pUC19:ALA10-GFP et p102:ALIS1-CFP (première ligne) ou avec pUC19:ALA10-GFP et p102:ALIS5-CFP (deuxième ligne). Barre d'échelle=10µm*

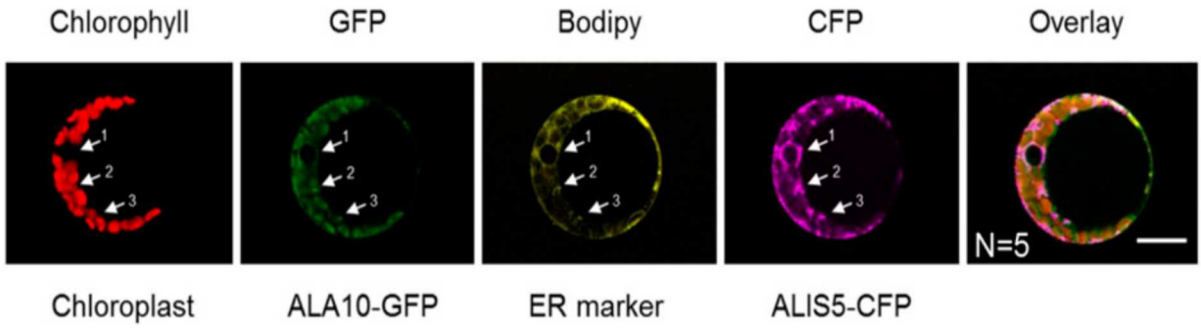


Figure 31 : Colocalisation ALA10-GFP/ALIS5-CFP/BODIPY. *Les protoplastes sont transfectés avec pUC19:ALA10-GFP et p102:ALIS5-CFP après 40 minutes d'incubation avec le marqueur du RE: BODIPY TR Glibenclamide en D, les flèches indiquent la colocalisation des signaux GFP, CFP, et du marqueur du RE autour du noyau (flèche1) ou à proximité directe des chloroplastes (flèches 2 et 3). Le vert, jaune, magenta, et rouge représentent en fausses couleurs la GFP, le marqueur du RE, la CFP, et l'autofluorescence de la chlorophylle. Barre d'échelle=10µm.*

e. Surexpression de ALA10-GFP in planta

Le système d'expression en protoplaste, bien que présentant un certain nombre d'avantages évoqués précédemment, ne permet l'analyse de la localisation que dans des cellules du mésophylle isolées. Pour évaluer le rôle d'ALA10 à l'échelle de la plante, nous avons analysé des lignées d'*Arabidopsis* exprimant ALA10 à des niveaux différents. Une lignée KO issue de la banque de mutants du Salk Institute (Alonso et al., 2003) présente un ADN-T inséré au niveau du deuxième exon de la séquence codant pour ALA10 (SALK_024877C) (Figure 32A). Après sélection d'une plante homozygote pour cette insertion : la lignée a été recroisée 3 fois avec la lignée parentale WT Col-0 afin d'éliminer les insertions additionnelles. Les analyses par RT-qPCR ainsi que l'analyse par immunodétection ont permis de vérifier l'absence d'expression de la protéine ALA10 dans cette lignée (Figure 32B). Nous avons aussi sélectionné deux lignées indépendantes surexprimant ALA10 fusionnées à la GFP au niveau de la partie carboxyterminale d'ALA10 (ALA10-GFP), sous le contrôle du promoteur 35S. Cette construction a été

insérée dans le génome des plantes par transfection médiée par *Agrobacterium tumefaciens*. De ce fait ces deux lignées, L1 et L2, expriment ALA10-GFP à des niveaux différents, respectivement 4 et 60 fois le niveau d'expression du gène endogène (Figure 33.B). Par ailleurs nous avons obtenu une lignée exprimant ALA10-GFP sous le contrôle du promoteur 35S dans le contexte génétique mutant pour ALA10, nous l'avons appelé C1 (voir Matériel et méthodes partie III.B). La protéine chimérique ALA10-GFP a une taille théorique de 163kDa. Par Western blot en utilisant un anticorps anti-GFP, un signal est effectivement obtenu à cette taille dans la L1 et la L2 et absent dans le Col0 (Figure 33.C). Le signal obtenu par immunodétection pour la L2 est légèrement plus intense que dans la L1 mais cette différence n'est pas proportionnelle à la différence au niveau des ARNm. Cette absence de linéarité entre l'expression de l'ARNm et la quantité de protéine ALA10 ou ALA10-GFP suggère l'existence d'une régulation post traductionnelle d'ALA10.

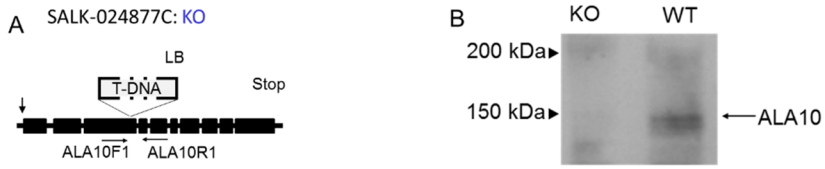


Figure 32 : Description de la lignée KO pour ALA10. *A. représentation schématique de la position du T-DNA inséré dans la séquence codante d'ALA10 dans le KOala10, les flèches représentent la position des primers utilisés pour le génotypage. B immunodétection de la protéine ALA10 dans les lignées KO et WT.*

.

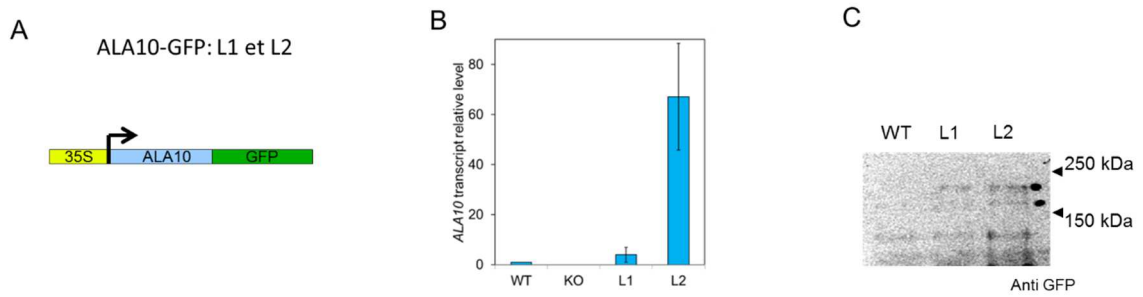


Figure 33 : Expression d'ALA10 dans les lignées mutantes pour ALA10. *A. Représentation schématique de la construction utilisée pour l'expression stable T-DNA inséré dans la séquence codante d'ALA10 B. Analyse par qRT-PCR de l'accumulation de l'ARNm codant pour ALA10 ou ALA10-GFP. ARNm extrait à partir de feuilles des différentes lignées WT , KOala10, L1 et L2, expressions normalisé par l'expression des gènes de références ACT8 (At1g49240) et UBQ10 (At4g05320). L'expression d'ALA10 ou ALA10 –GFP dans chacune des lignées est normalisée par l'expression du gène natif ALA10 dans le WT. C. Immunodétection des protéines ALA10 et ALA10-GFP dans les lignées WT, L1 et L2.*

La fusion avec la GFP nous permet d'observer in planta la localisation de la protéine ALA10 recombinante (Figure 34). Bien que la L1 présente une expression du transgène 4 fois plus forte que l'expression du gène endogène, il a été impossible d'observer le signal GFP en microcopie confocale car celui-ci était trop faible. Nous avons donc concentré nos observations sur les lignées L2 et C1. Dans ces lignées, en dépit du fait que le promoteur 35S soit un promoteur viral fort, le signal GFP n'est observable qu'aux premiers stades de croissance: des cotylédons jusqu'au stade 4 vraies feuilles, soit deux à trois semaines de culture en *in vitro*. Nous avons observé les feuilles et cotylédons des différentes plantes issues de ces lignées et nous avons remarqué que la protéine recombinante est localisée différemment en fonction du tissu observé. En effet, dans les cellules du mésophylle et les cellules de garde, il apparait que le signal GFP est localisé dans les endomembranes à proximité des chloroplastes (Figure 34). Or (Andersson et al., 2007a, b) ont montré que certains domaines du RE étaient associés spécifiquement aux plastes. La localisation d'ALA10-GFP pourrait donc être dans ces

zones nommées PlAM (Plastid Associated Membrane). Cependant dans les cellules de l'épiderme, le signal est observé au niveau de la membrane plasmique ou dans les endomembranes à proximité de la membrane plasmique (Figure 34).

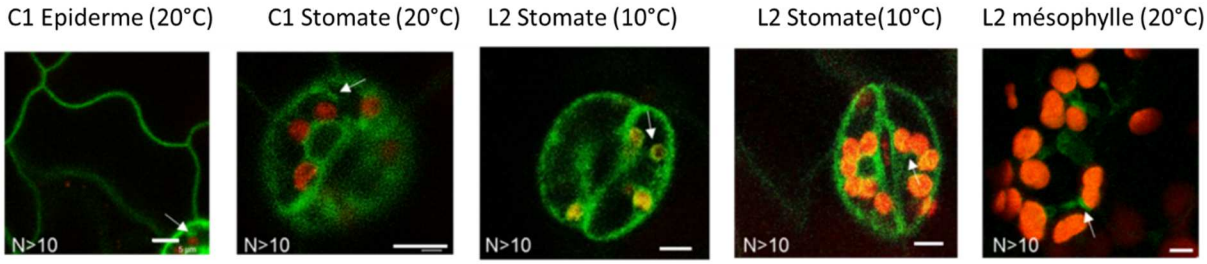


Figure 34 : Observation en microscopie confocale des lignées C1 et L2. *Observations en microscopie confocale de feuilles au terme de 15 jours de culture à 20°C, ou de 7 semaines à 10°C. Superposition de la fluorescence de la GFP en vert avec la fluorescence de la chlorophylle en rouge. Les tissus observés sont indiqués en haut. Les flèches blanches présentent les localisations dans les endomembranes à proximité des chloroplastes. Barre d'échelle 10µm.*

Cette localisation au niveau de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme est cohérente avec les observations de (Poulsen et al., 2015). Par ailleurs le fait qu'en fonction du tissue ALIS1 et ALIS5 puisse être différemment exprimées, ou que l'environnement protéique soit différent du fait de la présence ou de l'absence de chloroplastes actifs, pourrait expliquer cette localisation différentielle d'ALA10 GFP.

f. Discussion sur la localisation d'ALA10

Ainsi, nous avons pu déterminer par BiFC qu'ALA10 interagit avec ALIS1 et ALIS5 et que cette interaction semble se produire à différentes localisations subcellulaires: dans et/ou à proximité de la membrane plasmique pour ALA10 avec ALIS1 et au niveau du RE à proximité des chloroplastes pour ALA10 avec ALIS5. En exprimant chacune de ces protéines étiquetées avec des fluorophores nous avons pu confirmer ces deux localisations. Nous avons aussi fait le même type d'observations sur des protoplastes transfectés uniquement avec chacune des constructions indépendamment, dans ce cas, les signaux GFP ou CFP sont observés dans l'ensemble du RE. De façon générale il apparait que la localisation d'ALA10 soit dépendante de la présence d'une ALIS et de la qualité de l'ALIS

Cette localisation différentielle peut sembler en partie contradictoire avec les travaux de (Poulsen et al., 2015). Cependant il est à noter que les constructions utilisées ne sont pas les mêmes: en raison de la présence putative d'un transit peptide au niveau du Nter d'ALA10, nous avons utilisé une fusion à la GFP en Cter, ces auteurs ont choisi une fusion à la GFP en N-ter, de plus les observation faites par (Poulsen et al., 2015), ont été faites dans un système hétérologue (épiderme de tabac) qui de surcroit ne contient pas ou peu de chloroplastes, lesquels lorsque présents, sont plus petits et présentent moins de thylacoïdes que les chloroplastes trouvé dans le mésophylle (Barton et al., 2016). Enfin nous avons pu observer que lorsqu'exprimée seule de façon stable dans les plantes, ALA10-GFP présente une localisation différente en fonction du tissu observé: membrane plasmique dans l'épiderme et endomembranes à proximité des chloroplastes dans les cellules du mésophylle. Ces observations pouvant résulter d'une expression différentielle des ALIS dans ces tissus et de la présence de chloroplastes actifs, sont cohérentes avec les observations faites sur protoplastes. Ainsi nous avons utilisé les lignées L1, L2 et KOala10 pour déterminer le rôle d'ALA10 *in planta* au niveau des tissus photosynthétiques.

2. Effet d'ALA10 sur la Balance MGDG/PC

a. Effet de l'expression d'ALA10 sur la croissance

Pour mesurer l'effet d'ALA10 sur la croissance des plantes nous avons cultivé les différentes lignées en parallèle sur milieu MS solide, à 20°C, soumises à différente photopériodes: jours longs et jours courts. La taille des plantes a été déterminée à partir de photographies prises à différents temps de croissance en utilisant le logiciel ImageJ et l'outil "Analyse Particule" de ce logiciel. Au terme de 2 semaines de croissance dans ces conditions, aucune différence significative n'a été observée concernant la taille des rosettes quelle que soit la photopériode (Figure 35A et E). Du fait de l'augmentation de l'expression d'ALA10 quand les plantes sauvages sont traitées avec la Galvestine-1 1 (voir Introduction partie 4.b.1), nous avons voulu déterminer si le niveau d'expression d'ALA10 avait une influence sur l'impact de cette drogue. Pour cela nous avons cultivé les plantes pendant 15 jours sur milieu MS solide contenant 100µM de Galvestine-1-1, ou sur milieu contrôle contenant le solvant de la Galvestine-1-1: le DMSO (1% final). Sur milieu contrôle (DMSO) seul de faibles variations de surface des rosettes sont observées, la seule différence statistiquement significative concerne la L1 qui apparait légèrement plus grande que le WT. Lors du traitement à la Galvestine-1-1 toutes les lignées, comparées à la condition contrôle, présentent des diminutions de la surface foliaire. Cependant, lors de ce traitement les diminutions de surface des rosettes sont plus marquées pour le KOala10 que pour le WT, et cette diminution dans le WT est plus importante que pour les deux surexpresseurs (Figure 35C et D, G, H). Ce phénotype de croissance des feuilles en lien avec l'expression d'ALA10 lorsque la synthèse du MGDG est inhibée nous permet d'émettre l'hypothèse que cette protéine a un effet protecteur sur cette voie de synthèse.

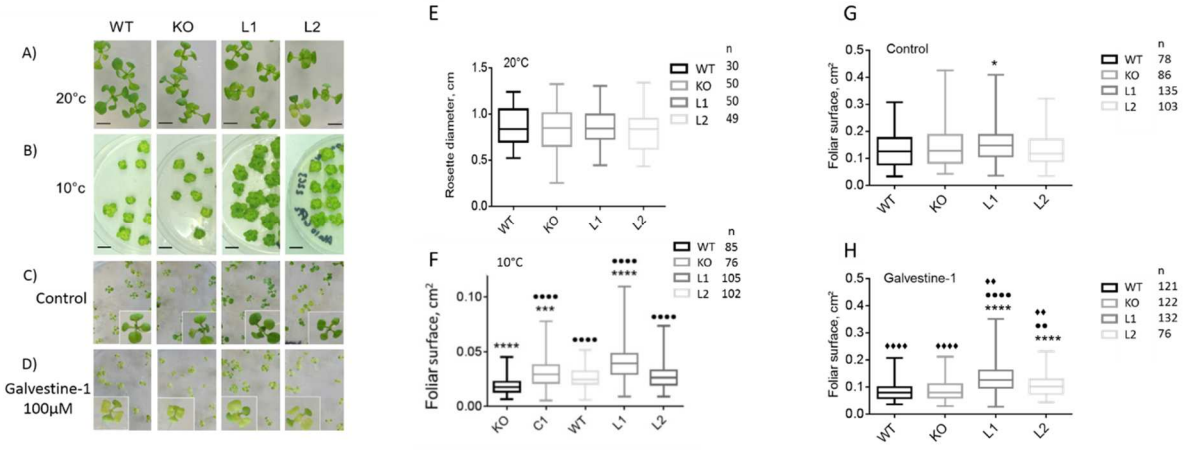


Figure 35 : Phénotype de croissance des différentes lignées ALA10*. A : Plantes cultivées en milieu MS standard pendant 2 semaines à 20°C ; B : Plantes cultivées pendant 7 semaines à 10°C en milieu MS standard ; C : Plantes cultivées pendant 15 jours (3 jours à l'obscurité suivi de 12 jours avec une photopériode de 14h) en milieu MS+ solvant Galvestine-1 (DMSO) ; D : Plantes cultivées pendant 15 jours (3 jours à l'obscurité suivi de 12 jours avec une photopériode de 14h en milieu MS+Galvestine-1 100µM). E, F, G et H Analyse statistique du diamètre des rosettes (E), ou de la surface foliaire (F, G, H) dans les conditions indiquées mesurées grâce au logiciel image J. Les résultats sont donnés sous forme de box plot, la médiane est représentée par la ligne à l'intérieure du rectangle, les lignes supérieures et inférieures représentent respectivement les premiers et quatrièmes quartiles, les barres d'erreurs représentent les valeurs extrêmes. Significance statistique calculée par t test de student *: différences par rapport au WT, •: différences par rapport au KO, ♦: différences par rapport a la L1. 1 symbole p<0.05, 2 symboles p<0, 01, 3 symboles p<0,001, 4 symboles p<0.0001*

Par ailleurs la littérature concernant les ATPases de type P_4 nous informe que certains des mutants d'ATPase de type P_4 présentent des phénotypes de croissance fort lors de culture au froid. Le mutant *drs2* de levure présente un défaut de croissance à 10°C (Pomorski et al., 2003). De même, le mutant ALA3 présente une forte réduction de la croissance à 10°C (McDowell et al., 2013). Nous nous sommes donc interrogés si c'était aussi le cas pour les mutants ALA10. Pour répondre à cette question, nous

avons cultivé les différentes lignées de plantes dans les mêmes conditions que précédemment (milieu MS solide, jours longs) mais à une température constante de 10°C et la taille des feuilles a été mesurée au terme de 7 semaines de croissance. Dans ces conditions, on observe une nette diminution de la taille des rosettes par rapport aux conditions contrôles. Cette diminution est plus marquée dans le KO et le WT comparés aux lignées C1, L1 et L2 (Figure 35b et F). Ce résultat nous permet d'une part de confirmer que la lignée C1 se comporte comme un surexpresseur et nous conforte dans l'idée que la protéine ALA10-GFP est bien active, mais aussi qu'ALA10 est importante dans des conditions limitant la croissance et modifiant la synthèse des galactolipides (Uemura and Steponkus, 1997).Afin de mieux comprendre l'impact d'ALA10 sur la synthèse de MGDG, nous avons analysé le profil lipidique de chacune des lignées cultivées dans les conditions précédemment décrites.

b. Effet d'ALA10 sur la balance MGDG/PC

Dans un premier temps nous avons analysé la composition lipidique de feuilles issues des différentes lignées mutantes pour ALA10, cultivées pendant 15 jours en jours longs, en présence ou non de 100µM de Galvestine-1-1. Nous avons d'abord mesuré la quantité d'acides gras totaux par mg de poids frais pour chacune des lignées. Le traitement par la Galvestine-1-1 provoque une diminution de la quantité d'acide gras par mg de poids frais pour toutes les lignées mais les différences de niveau d'expression d'ALA10 sur l'accumulation d'acide gras n'ont pas d'influence. En effet pour une même condition, bien qu'il y ait de légères variations entre les différentes lignées (la L1 semble accumuler un peu plus d'acides gras que les autres lignées en condition contrôle, et lors du traitement à la Galvestine-1 le KOala10 semble accumuler légèrement plus d'acide gras que les autres lignées), ces différences ne sont pas statistiquement significatives (Figure 36). Il semblerait donc qu'ALA10 n'ait pas d'influence significative sur la synthèse des acides gras dans ces conditions.

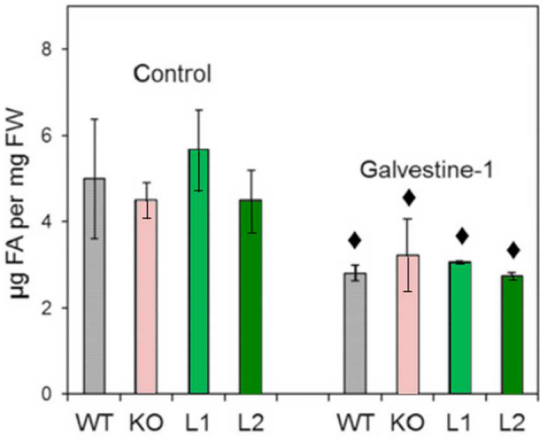


Figure 36 : Teneur en acides gras totaux par mg de matière fraiche dans les différentes lignées mutantes pour ALA10. *Les plantes ont été cultivées en milieu MS contenant 2% de sucrose et 0,2% de tween 20 avec ou sans 100µM de Galvestine-1. ♦ représentent des différences statistiquement significatives à p<0.01 par rapport à la même lignée dans les conditions contrôlesT-test de Student. Les résultats représentent la moyenne de trois réplicats biologiques +/- la déviation standard. Seules les partie aériennes des plantes ont été récolté et analysées.*

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet d'ALA10 sur l'abondance relative des différents lipides dans les mêmes conditions (Figure 37). En condition contrôle, on observe de légères variations concernant principalement le MGDG et la PC. Les teneurs en MGDG augmentent dans les deux lignées surexprimant ALA10 par rapport au KOala10 et au WT, alors que la teneur en PC diminue dans les lignées L1 et L2 et qu'elle augmente très légèrement dans le KOala10. La même analyse effectuée sur

les plantes traitées à la Galvestine-1-1 révèle d'une part que les trois lignées mutantes pour ALA10 présentent une diminution de la quantité de MGDG plus importante que dans le WT, cette diminution semble plus importante dans le KOala10 que dans les lignées surexpresseurs. Par ailleurs il apparait que dans ces conditions, la L1 présente une plus grande proportion de DGDG que les autres lignées. De plus, il semblerait que les variations de la proportion de PC dans les différentes lignées soient plus prononcées que dans les conditions contrôles et la proportion d'acide phosphatidique est augmentée dans les deux surexpresseurs (Figure 37 b et c). Ces variations bien que faibles sont reproductibles d'une condition sur l'autre.

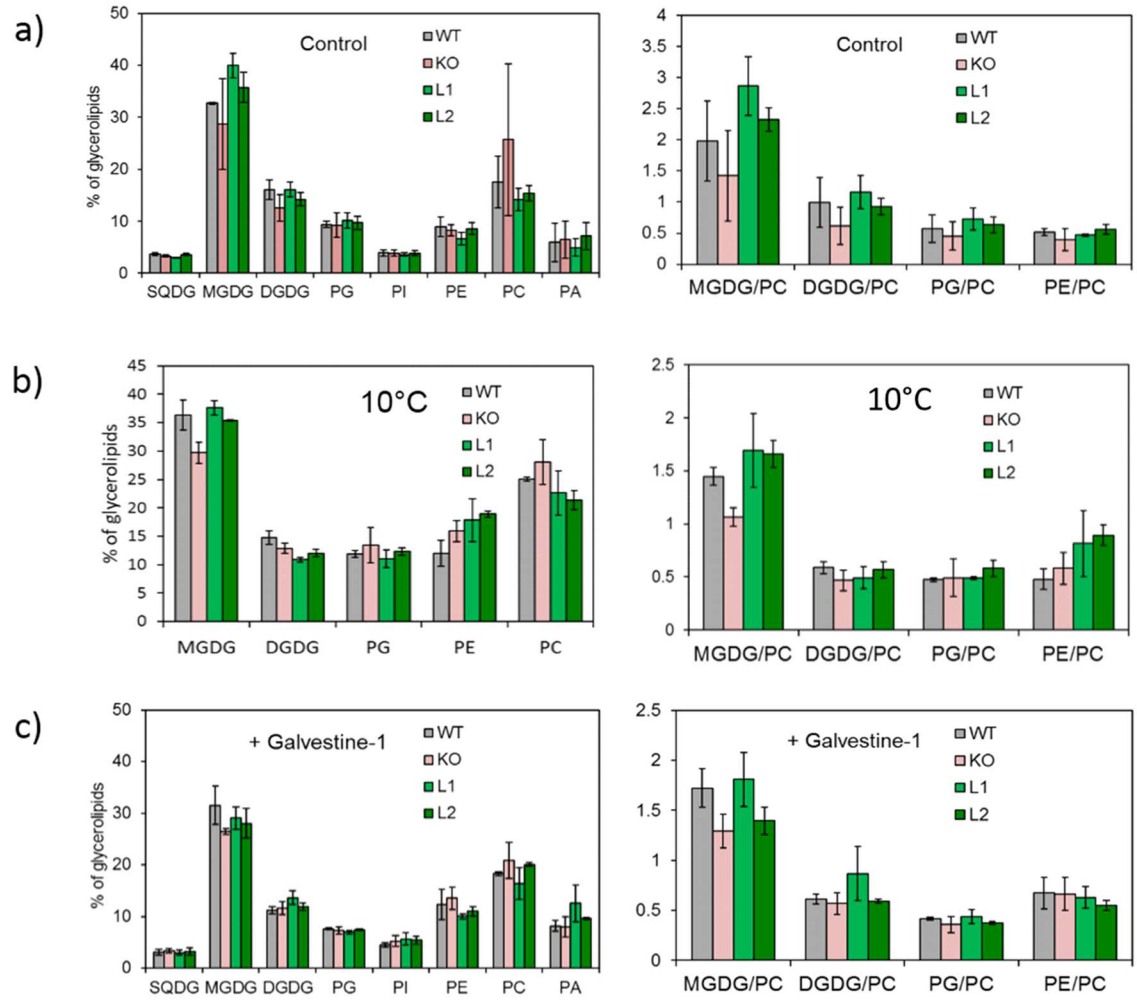


Figure 37 : Analyse de la composition lipidique des différentes lignées mutantes pour ALA10 en fonction des conditions de croissance. *La première colonne présente les quantités relatives de chacune des classes de lipide, la colonne de gauche représente les ratios des lipides majoritaires sur la PC. Toutes les plantes ont été cultivées en parallèle. A et C Culture pendant 15 jours en jours longs sur milieu MS contenant 2% de sucrose et 0,2% de Tween 20, le traitement à la Galvestine-1 est effectué par ajout de 100µM de Galvestine-11. B Les plantes sont cultivées pendant 7 semaines en jours longs à 10°C sur milieu MS contenant 0,8% de sucrose. Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

Pour comparer les résultats entre toutes les conditions testées, nous avons analysé les proportions des différents lipides par rapport à la PC qui est le lipide majoritaire des endomembranes. Le ratio MGDG/PC et, dans la condition contrôle, le ratio DGDG/PC présentent des variations qui paraissent en corrélation avec l'expression d'ALA10. En effet ces ratios diminuent dans le KOala10 et augmentent dans le surexpresseur L1 et dans une moindre mesure dans la L2 (Figure 37). Quand le même type

d'analyse est effectuée sur les plantes ayant été cultivées à 10°C des variations dans le même sens sont observées avec en particulier une nette diminution du ratio MGDG/PC dans le KO (Figure 37b).

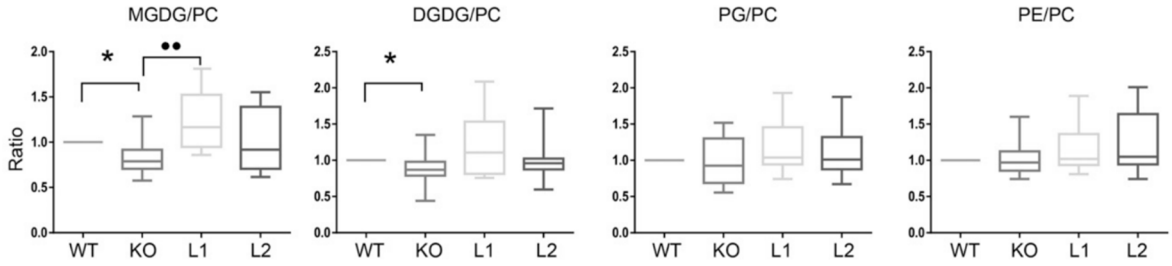


Figure 38 : Analyse statistique des ratios lipides/PC dans les feuilles des lignées ALA10 dans les différentes conditions de culture. *Les données à l'origine de cette analyse sont présentées dans la figure 35. PG: phosphatidylglycérol. Les résultats sont donnés sous la forme de box plot comme dans la figure 35. Le nombre de réplicas biologique est de 13 WT, 13 KO, huit L1 et huit L2. La signifiance statistique est calculée comme suit: les données du KO, de la L1 et de la L2 sont comparées au WT à l'aide d'un test de rang de Wilcoxon avec une médiane théorique de 1et P<0.05 (astérisque), ou comparées au KO par un test U de Mann-Whitney avec P<0.05 et des Pvalue entre 0.01 et 0.001 (cercles). Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

Ces différences, bien que reproductibles, apparaissent relativement faibles et varient en intensité selon les conditions, nous avons donc voulu évaluer la validité statistique de ces résultats. Pour cela nous avons regroupé les données concernant les mêmes lignées mais issues de différentes expériences indépendantes: culture en jours longs, jours courts, traitement à la Galvestine-1, contrôle de la Galvestine-1 (DMSO 1%), 20°C, 10°C (Figure 38). Cette analyse a permis de mettre en évidence que les variations du ratio MGDG/PC entre les différentes lignées sont dépendantes de l'expression d'ALA10 alors que les ratios des autres lipides majeurs sur la PC ne sont pas significativement impactés (Figure 38). Le KOala10 a un rapport MGDG/PC plus faible que le WT alors que les surexpresseurs ont un rapport MGDG/PC plus élevé. Il est à noter que dans la plupart des conditions la L1 présente un phénotype plus marqué que la L2 qui pourtant exprime plus fortement le transgène; cela nous indique l'existence d'un optimum de teneur en ALA10 au-delà duquel l'effet de la surexpression diminue. Cet optimum pourrait être dû à la disponibilité des ALIS dans ces lignées ou à un rétrocontrôle de l'homéostasie lipidique en réponse à une trop grande activité d'ALA10. Malgré cela, nous pouvons en conclure que dans les feuilles, ALA10 favorise la teneur en MGDG au détriment de la teneur en PC. Le MGDG étant un lipide spécifique des membranes plastidiales, et la PC étant absente des membranes photosynthétiques, ALA10 pourrait donc contribuer au maintien de la croissance en renforçant le développement des membranes photosynthétiques au détriment des autres membranes lorsque la synthèse des galactolipides est limitante.

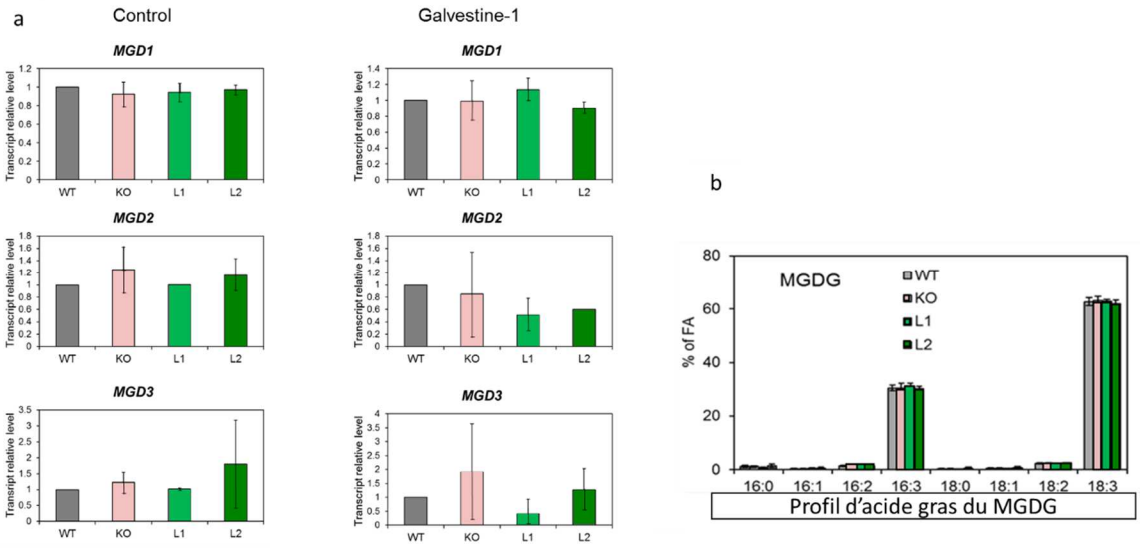


Figure 39 : a. Analyse de l'expression des MGD dans les lignées mutantes pour ALA10 par RT-qPCR. *ARN extraits sur des plantes au terme de 15 jours de croissance en présence de 100µM de Galvestine-1 ou de son solvant (DMSO 1%). L'expression des différents gènes est normalisé par l'expression des gènes de références ACT8 (At1g49240) et UBQ10 (At4g05320) et normalisé a 1 dans le WT.* ***b. Analyse de la composition en acide gras du MGDG en condition contrôle dans les différentes lignées mutantes pour ALA10.*** *Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

Il existe différents mécanismes faisant le lien entre MGDG et PC par lesquels ALA10 pourrait impacter le ratio MGDG/PC. En premier lieu, comme nous l'avons vu en introduction, la PC peut être un intermédiaire métabolique dans la synthèse du MGDG en étant converti en diacylglycérol. Cette voie de synthèse amène à la formation de MGDG avec une signature spécifique dite eucaryote au niveau du squelette diacylglycérol (un acide gras à 18 atomes de carbone en position sn-2). L'augmentation de cette voie entraine *in fine* un enrichissement du MGDG en acyl 18:3 par rapport au MGDG en 16:3, caractéristique de la voie plastidiale dite procaryote. Par ailleurs, MGD1, responsable de la majorité de la synthèse du MGDG dans les tissus chlorophylliens, est activée par l'acide phosphatidique (Dubots et al., 2010). L'hydrolyse de la PC en AP pourrait donc accroitre l'activité de MGD1, cela résulterait en une augmentation de la teneur en MGDG sans modification de sa composition en acide gras. Une troisième possibilité serait une augmentation de l'expression de MGD1 en lien avec le métabolisme de la PC. Cette dernière hypothèse n'est pas cohérente avec l'expression des protéines MGD dans les différentes lignées mutantes pour ALA10 dans lesquelles l'expression de ces protéines est relativement stable que ce soit lors du traitement à la Galvestine-1 ou dans les conditions contrôles relatives à ce traitement (Figure 39.a). De plus l'analyse de la composition en acide gras du MGDG nous informe qu'il n'y a pas d'augmentation d'acides gras à 18 atomes de carbone dans les différentes lignées étudiées (Figure 39.b). Cela nous amène à écarter la première hypothèse qui voudrait que la modulation du ratio MGDG/PC se fasse par un apport plus important de DAG, substrat de MGD1, issu de la PC. Ainsi il se pourrait que les modulations du ratio MGDG/PC qui apparaissent dans les mutants ALA10 soient dues à une variation de l'activation de MGD1 par le AP issu de l'hydrolyse de la PC. Cette hypothèse est cohérente avec l'expression de PLDγ1, enzyme cytosolique convertissant la PC en AP, qui se trouve être parmi les protéines les mieux coexprimée avec ALA10 (Figure 40).

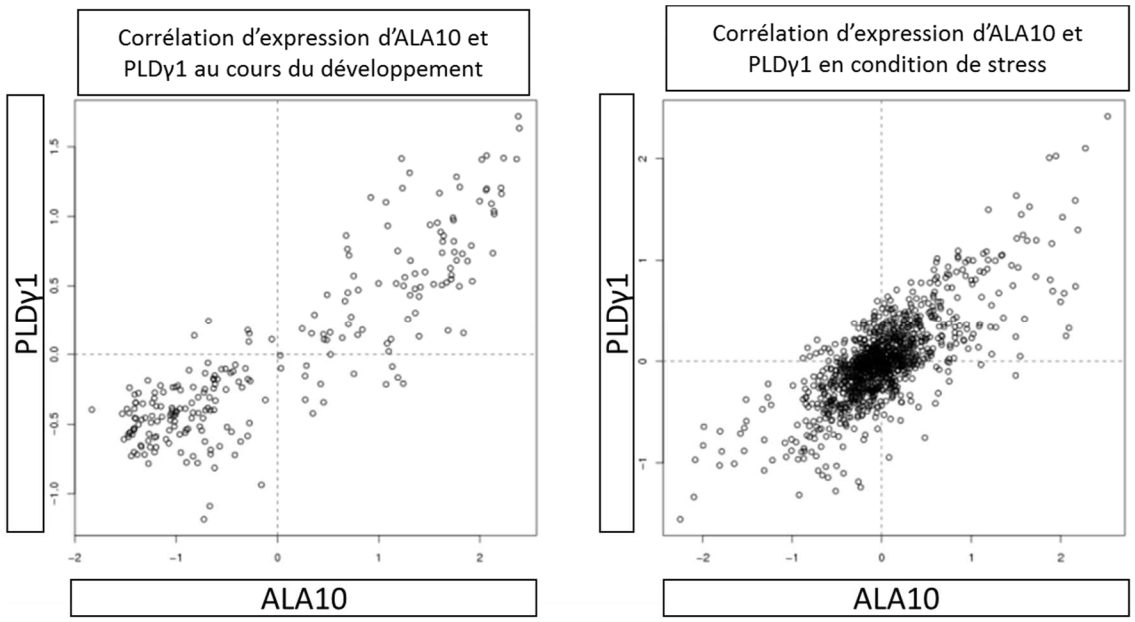


Figure 40 : Corrélation d'expression entre ALA10 et PLDγ1 lors du développement (gauche) et lors des conditions de stress (droite). *Données obtenues par analyse bio-informatique sur BAR (http://bar.utoronto.ca/) (Toufighi et al., 2005).*

c. ALA10 et la photosynthèse

Le MGDG est le principal composant des membranes photosynthétiques, ALA10 modulant la synthèse de ce lipide, nous nous sommes interrogés sur l'impact que pouvait avoir ALA10 sur la photosynthèse. Les mesures des différents paramètres photosynthétiques sont réalisées à l'aide de la technique PAM (pour Pulse Amplitude Modulation) qui tire parti du fait que la chlorophylle, lorsqu'elle est éclairée, peut réémettre une partie de l'énergie reçue sous forme de fluorescence. L'intensité de cette fluorescence est fonction de trois paramètres: la capacité maximale d'absorption des électrons par les photosystèmes notée Fv/Fm, l'efficacité de transfert des électrons entre les photosystèmes II et I (notés ETR) et de la dissipation thermique de l'énergie lumineuse (NPQ pour non photochemical quenching) (Figure 41).

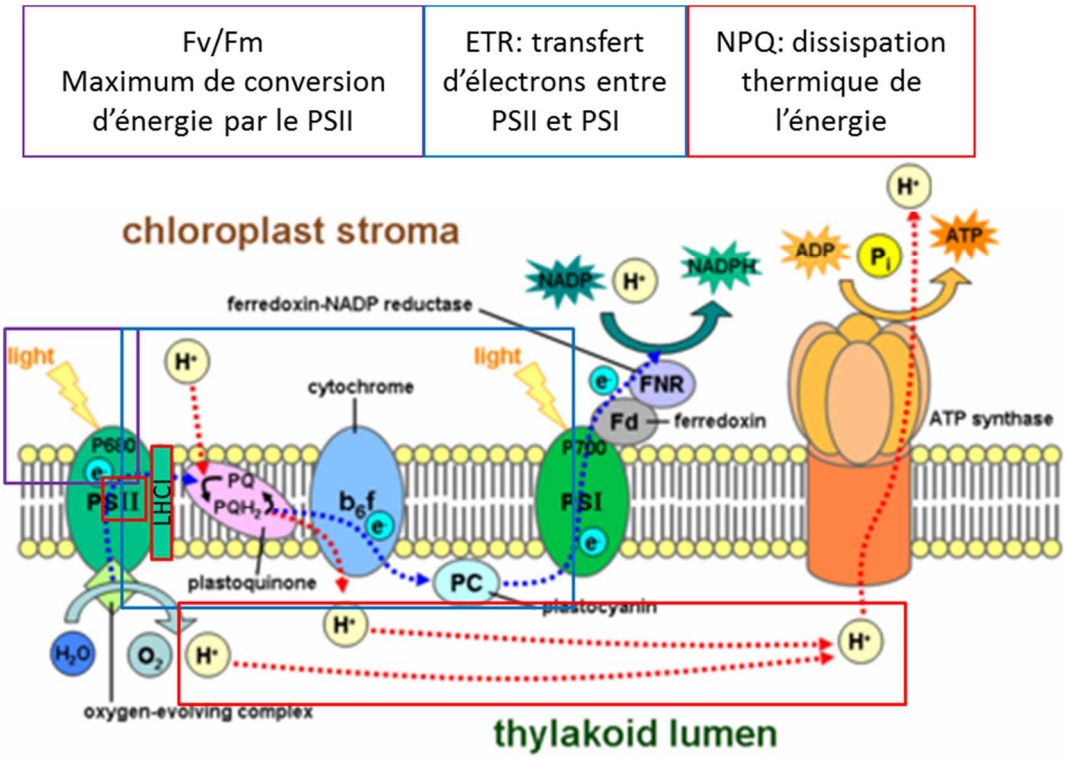


Figure 41 : ***Schématisation de la photosynthèse et mesures de fluorescence associées.*** *La photosynthèse met en jeu l'absorption de lumière par les photosystèmes (PSI et PSII), le transfert d'électron entre les deux photosystèmes et la génération d'un gradient de proton de part et d'autre de la membrane du thylacoïde. La fluorescence du PSII est variable contrairement à celle du PSI, ces variations sont dues d'une part à sa capacité maximale à absorber l'énergie lumineuse mesurable par Fv/Fm, à la vitesse de transfert des électrons entre le PSII et le PSI appelé ETR, et aux mécanismes de protection des photosystèmes : le NPQ*

Les mesures ont été réalisées sur des plantules de 15 jours cultivées *in vitro* en milieu solide en jours longs à 20°C ou à 10°C, une condition dont on a vu qu'elle influence la croissance des différentes lignées mutantes ALA10. Dans les conditions testées, nous n'avons pas observé de différence significative concernant le Fv/Fm (figure 42 A et C). De même la valeur maximale du NPQ est stable entre les différentes lignées pour les mêmes conditions de culture. L'analyse de la vitesse de mise en place du NPQ, c'est-à-dire le temps qu'il faut pour atteindre la valeur maximale du NPQ, montre cependant que le KOala10 présente une légère diminution de cette vitesse comparé aux autres lignées (Figure 42 B et D). Cette différence est plus marquée lorsque les plantes sont cultivées à 10°C.

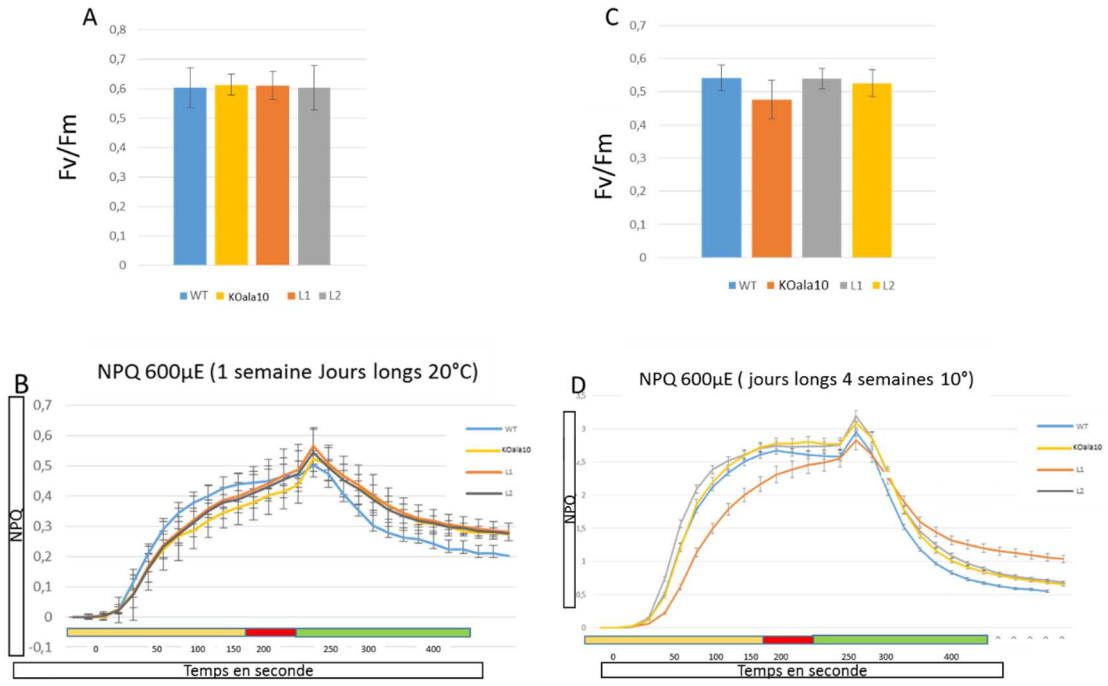


Figure 42 : Impact d'ALA10 sur la photosynthèse. *A,C: Mesure de la capacité maximale d'absorption de la lumière par le PSII (Fv/Fm) sur les plantes mutantes pour ALA10 cultivées en jours longs a 20°C pendant une semaine (A) et à 10°C pendant 4 semaines (C) . B et D: Mesures des valeur du NPQ à 600µE sur les plantes des lignées mutantes pour ALA10 cultivées en jours long 20°C (B) ou 10°C (D) pendant une et quatre semaine respectivement. Le rectangle jaune représente la mise en place du NPQ, en rouge le NPQ maximal, en vert la relaxation du NPQ. Toutes les mesures ont été faites sur 30 plantes de chaque lignées, les données sont représentatives de quatre réplicas biologiques. Representation graphique de la moyenne +/- la deviation standard d'un replica biologique.*

Le NPQ est déclenché principalement par une acidification trop importante au niveau du lumen des thylacoïdes et un des principaux mécanismes par lequel l'énergie est dissipée est le transfert de cette énergie à des pigments non chlorophylliens: les xanthophylles. Ces pigments dérivés des caroténoïdes, sont chez *Arabidopsis* principalement la zéaxanthine et la violaxanthine. La zéaxanthine est la seule des deux molécules à pouvoir dissiper l'énergie lumineuse sous forme de chaleur. Elle est obtenue par époxydation de la violaxanthine *via* la violaxanthine époxydase, la réaction inverse étant spontanée et permettant le retour du système à un état dit relaxé dans lequel la valeur du NPQ est de 0. Ces réactions d'époxydation/dé-époxydation sont regroupées sous le terme cycle des xanthophylles (Figure 43). Le fait que le KOala10 ait une vitesse de mise en place et de relaxation du NPQ plus lente que les autres lignées peut s'expliquer par le fait qu'une des enzymes impliquées dans le cycle des xanthophylles a une activité qui nécessite des structures lipidiques dites en hexagonal II lesquelles sont favorisées lorsque le MGDG est le lipide majoritaire. Dans le KOala10, la diminution du rapport MGDG/PC soutient l'idée selon laquelle la synthèse de MGDG dans ce mutant serait plus faible, ce qui pourrait impacter la formation de structures en hexagonal II au niveau des thylacoides, ce qui diminuerait l'activité de la violaxanthine époxydase réduisant d'autant la vitesse de mise en place du NPQ. Ainsi ALA10 n'a apparemment pas d'effet sur l'efficacité de la photosynthèse probablement parce que l'impact sur le métabolisme des lipides en terme de quantité est relativement faible, l'effet d'ALA10 sur le NPQ est faible et probablement très indirect par rapport à l'activité d'ALA10, nous avons donc choisi de ne pas développer plus avant l'étude de l'effet d'ALA10 sur la photosynthèse.

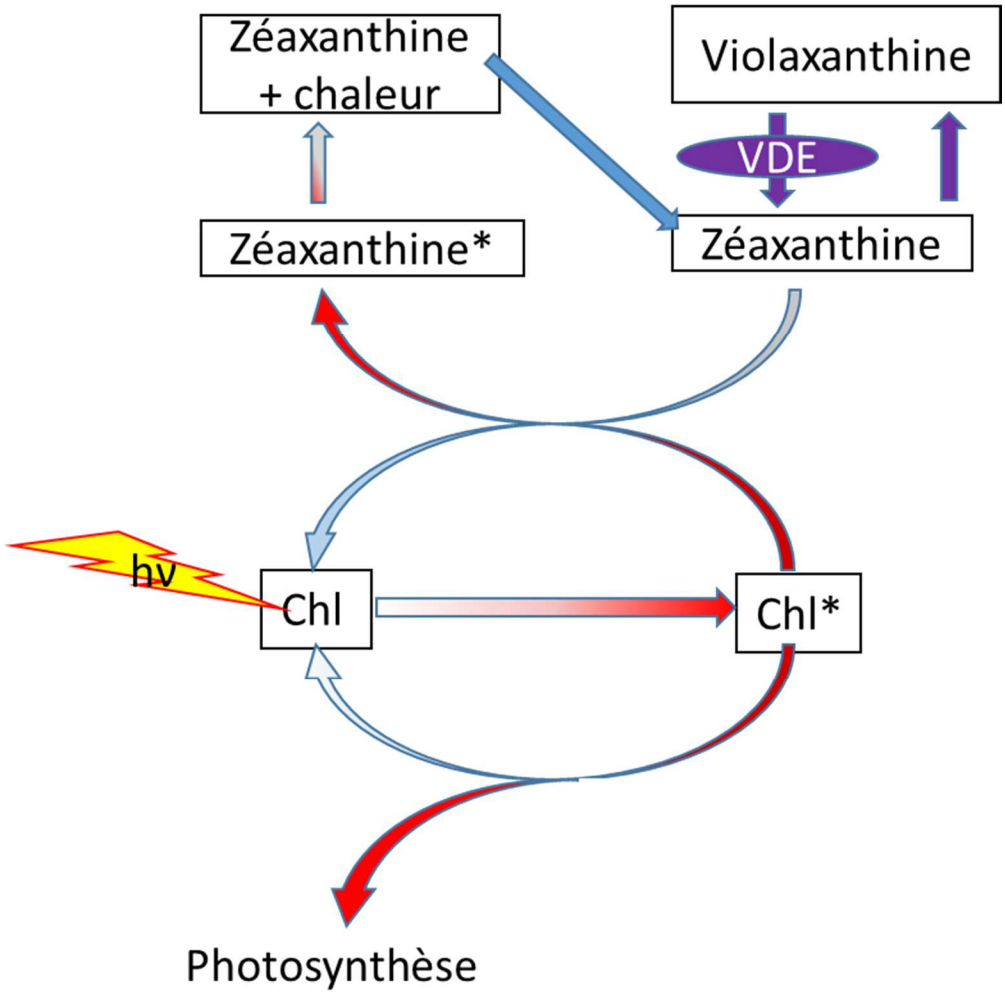


Figure 43 : Implication des xanthophylles dans la dissipation thermique de l'énergie lumineuse. *Quand la lumière est intense, l'activité des photosystèmes entraine une acidification du pH et induit l'activité de la violaxanthine dé-époxydase (VDE) générant de la zéaxanthine. La zéaxanthine peut alors récupérer une partie des électrons de la chlorophylle excité (Chl*) permettant la dissipation thermique de l'énergie en excès (en rouge). Ce qui évite ainsi le débordement de la photochimie et la production d'espèces réactives de l'oxygène. Quand la lumière est faible l'époxydation de la zéaxanthine la convertie en violaxanthine, incapable de capter les électrons de la chlorophylle excité et favorisant de ce fait leur transfert vers la photosynthèse. Flèches rouges: transfert d'électrons, flèches violette: réactions enzymatiques*

3. ALA10 et le métabolisme de la PC.

a. Effet d'ALA10 sur la composition en PC des chloroplastes

Dans les cellules du mésophylle, la synthèse du MGDG est principalement réalisée par MGD1 qui se trouve dans la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes. La PC, quant à elle, est synthétisée *de novo* dans le RE et est le lipide majeur des membranes extraplastidiales. La PC chloroplastique est cantonnée à la membrane externe de l'enveloppe où elle représente environ 30% des lipides de cette membrane. De plus, cette membrane présente une forte asymétrie vis-à-vis de la localisation de la PC. En effet sur des chloroplastes purifiés, il a été montré que la PC est présente quasi exclusivement dans le feuillet externe de la membrane externe de l'enveloppe (Dorne et al., 1985). Or, nous avons vu qu'ALA10 impacte l'équilibre entre MGDG et PC potentiellement via une activation de MGD1 par le AP dérivé de la PC. Cette hypothèse sous-tend l'existence d'un transfert lipidique depuis les membranes enrichies en PC vers les chloroplastes. Nous avons donc voulu évaluer si l'expression d'ALA10 modifie la composition lipidique des chloroplastes.

Pour cela nous avons analysé les lipides issus de chloroplastes purifiés à partir de feuilles des différentes lignées mutantes pour ALA10. Dans les fractions chloroplastiques isolées, nous avons constaté l'absence de PE et d'AP (Figure 44A). La PE étant un des composants majeurs des membranes extraplastidiales, les chloroplastes isolés sont donc très faiblement contaminés par des membranes extraplastidiales. Les chloroplastes sont très riches en galactolipides (50 à 60%de MGDG et 20 à 30% de DGDG) et pauvres en phospholipides, principalement du PG (10 à 15%) et de la PC (inférieure à 5%). Ils contiennent aussi du sulfolipide (SQDG) aux alentours de 4% comme précédemment décrit dans la partie I.2 de la synthèse bibliographique). La comparaison des compositions lipidiques entre les différentes lignées ne révèle que de très faibles variations non significatives de proportion des différents lipides. (FIgure 44B). Malgré l'absence de différences significative concernant les teneurs en lipides, l'analyse de la composition en acide gras de la PC quant à elle, montre par contre des variations importantes dans la L1 et la L2 comparées aux autres lignées (Figure 44C). En effet, dans ces lignées, nous observons un enrichissement en 16:0 et de façon plus prononcé en 16:1 ainsi qu'une diminution significative en 16:3. Parallèlement, on observe une très nette diminution de la proportion de 18:3 dans les deux surexpresseurs ainsi qu'une légère diminution en 18:2. Cette diminution des acides gras très désaturés sur la PC suggère que les acides gras portés sur la PC sont des acides gras néosythétisés n'ayant pas encore été désaturés par les désaturases du reticulum. L'écart type important dans la lignée KO ne permet pas de conclure à une différence significative avec le WT, ce qui pourrait indiquer l'existence de mécanismes de compensation peut-être dus à une redondance fonctionnelle d'une autre ALA. La désaturation de la PC s'effectue dans le RE les acides gras 18:1 en position sn-2 sont désaturés séquentiellement en 18:2 et 18:3 par FAD2 et FAD3 respectivement. Il est possible que ALA10 interfère avec la désaturation de la PC dans le RE et/ou avec une modification du transfert de la PC depuis le RE vers le chloroplaste après désaturation de celle-ci. Cela semble confirmé par le rapport de l'efficacité de FAD2 sur l'efficacité de FAD3 (encart Figure 44C). Pour FAD2, l'efficacité est calculée par le ratio de la somme des teneurs en 18:2+18:3 divisée par la teneur en 18:1 , et pour FAD3 l'efficacité est donnée par le ratio 18:3/18:2. Ce rapport semble présenter une corrélation avec l'expression d'ALA10 (diminution dans le KOala10 et une augmentation dans un des surexpresseurs). Comme nous l'avons vu précédemment, ALA10 en association avec ALIS5 est localisée dans le RE à proximité des chloroplastes, ce qui apparait comme une localisation favorable à un rôle d'ALA10 dans l'approvisionnement du chloroplaste en PC venant du RE.

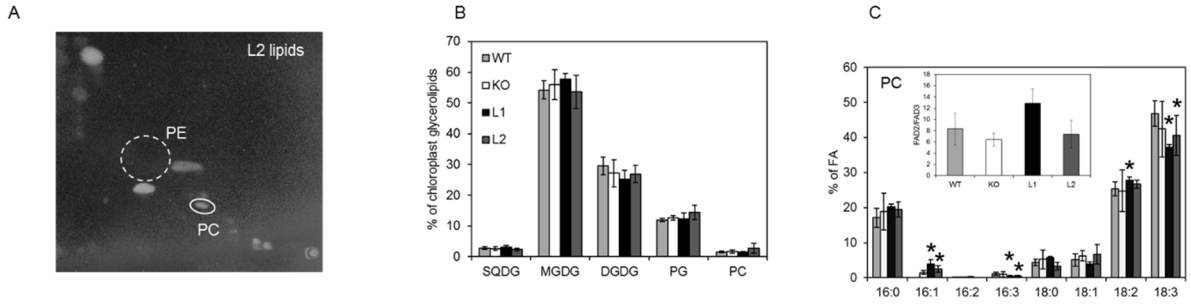


Figure 44 : Composition lipidique des chloroplastes purifiés à partir des feuilles des différentes lignées mutantes pour ALA10*. A Chromatographie 2D sur couche mince (2D-TLC) des lipides des chloroplastes purifiés de la L2. Les lipides sont révélés avec de l'acide 8-anilino-1-naphtalènesulfonique. La PC est facilement détectable mais le AP et la PE sont sous le seuil de détectabilité. B Composition glycérolipidique relative des chloroplastes des différentes lignées. C Profils d'acides gras de la PC chloroplastique des différentes lignées, dans l'encart, l'analyse du ratio de l'efficacité relative FAD2/FAD3 comme expliqué (Figure 45). Analyse statistique: les asterisques représentent des differences statitiquement significative par rapport au WT a p<0.05 (T-test de Student). Les différentes lignées sont cultivées à 22°C dans la même pièce de culture mais sur des temps décalés de manière à avoir suffisamment de plantes pour l'obtention des plastes compte tenue de l'espace disponible.*

b. Effet d'ALA10 sur la désaturation de la PC cellulaire.

La localisation d'ALA10 au niveau du RE et le fait qu'elle module la désaturation de la PC chloroplastique suggère que cette protéine joue un rôle dans le métabolisme de la PC au niveau des endomembranes et pas seulement dans la PC chloroplastique. Afin d'explorer cet aspect, nous avons choisi de travailler sur des cultures cellulaires, qui présentent l'avantage d'avoir une croissance rapide et un fort taux d'endomembranes comparé aux membranes plastidiales. Ces cellules sont quasiment dépourvues de chloroplastes comparées aux cellules issues de feuilles. Elles présentent en effet une très faible teneur en galactolipides et une composition lipidique largement dominée par la PC et la PE comme attendue du fait de la quasi absence de thylacoides (Figure 45A). Ce système permet en outre de limiter la désaturation des acides gras de la PC par éditions des acides gras entre la PC et les galactolipides. Comme observé dans les feuilles, la composition lipidique globale de ces cellules ne présente pas de différences majeures entre les lignées: seule une faible mais significative augmentation du ratio MGDG/PC est observée dans la L1 (Figure 45B). La composition en acide gras est par contre fortement modifiée dans les différentes lignées. Les profils de désaturation de la PC du KOala10 et de L1 sont très fortement impactés quand on les compare au WT. En effet, dans le KO et la L1, on observe une nette diminution en 16:0 et une augmentation en 18:1. Dans la L1, on observe une très forte augmentation en 18:2 et une diminution en 18:3 comparé au WT alors que le KO ne présente pas de différence par rapport au WT concernant le 18:2 et seulement une légère mais significative diminution en 18:3 (Figure 45C) Ces variations importantes indiquent une perturbation des activités de FAD2 pour la désaturation du 18:1 en 18:2, et de FAD3 pour la désaturation du 18:2 en 18:3. Ainsi, le KO et le surexpresseur présentent tous les deux une diminution générale de la désaturation comparée au WT, mais ces deux lignées ne sont pas affectées de la même manière au niveau des deux étapes de désaturation: le KO semble affecté en amont de FAD2 comme le montre l'augmentation en 18:1 et l'absence de modification concernant le 18:2 alors que la L1 semble affectée entre FAD2 et FAD3 du fait de l'augmentation en 18:2 et la diminution en 18:3 (Figure 45C).

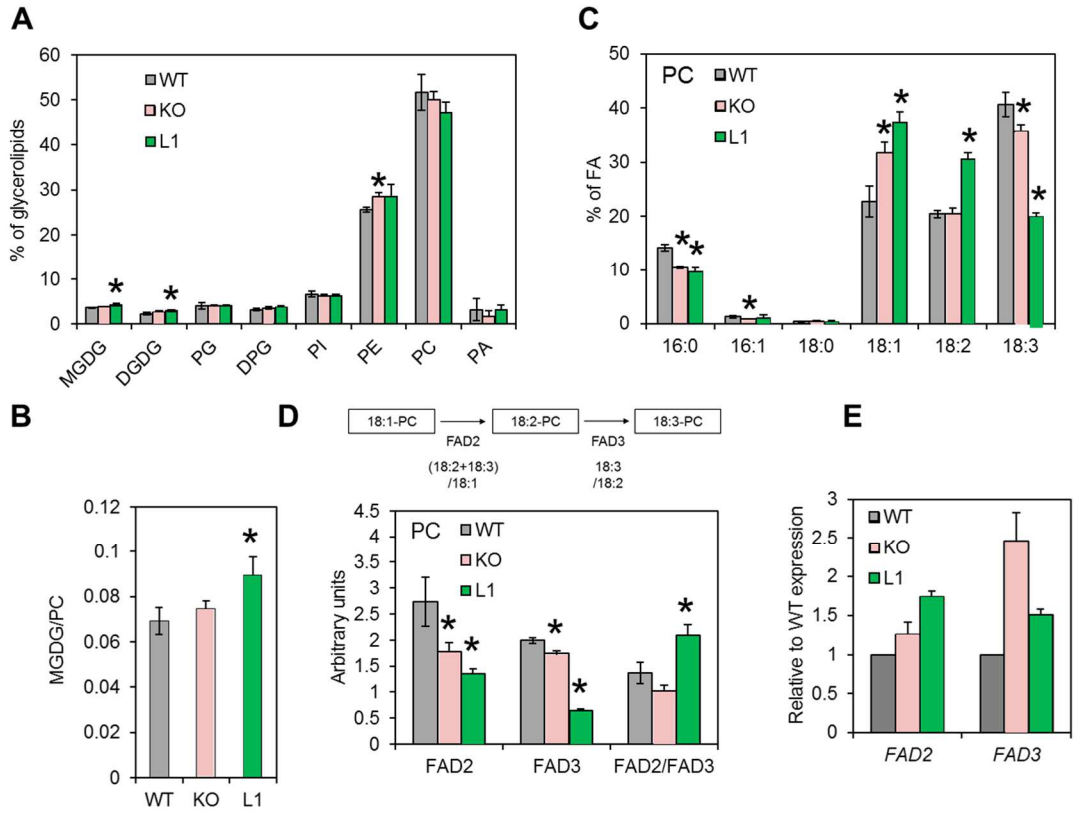


Figure 45 : Composition lipidique des cellules en culture issues des lignées mutantes pour ALA10. *A Composition glycérolipidique relative des cellules WT, KO et L1. MGDG: monogalactosyldiacylglycérol; DGDG: digalactosyldiacylglycérol; PG: phosphatidylglycérol; DPG: Diphosphatidyldiacylglycerol; PI: phosphatidylinositol; PE: Phosphatidyléthanolamine; PC Phosphatidylcholine; AP: Acide phosphatidique. B Ratio MGDG/PC. C Profil d'acides gras de la PC. D Analyse de l'efficacité de désaturation de la PC. L'efficacité relative de FAD2 et de FAD3 est calculée par le ratio produits/substrats. Dans le cas de FAD2 ([18:2+18:3]/18:1) et pour FAD3 (18:3/18:2). FAD2 sur FAD3 représente le rapport de l'efficacité relative de FAD2 sur celle de FAD3. E Expression relative des ARNm correspondant à FAD2 et FAD3. Chaque résultat est la moyenne +/- la déviation standard de trois à quatre réplicats biologiques cultivés en parallèle. Les astérisques représentent des différences significatives comparée au WT (T-Test de Student P<0,05)*

Pour analyser plus en détail la désaturation, nous avons calculé l'efficacité de chaque étape de désaturation en faisant le ratio produit/substrat de chacune des deux réactions comme expliqué précedement. Les efficacités de FAD2 et de FAD3 sont diminués à la fois dans le KO et le L1 suggérant qu'il existe un niveau optimal d'expression d'ALA10 nécessaire pour que ce processus de désaturation s'opère correctement. Cependant, l'efficacité de FAD2 est nettement plus perturbée dans le KO et l'efficacité de FAD3 l'est plus dans la L1 (Figure 45D). Ceci se reflète dans le ratio de l'efficacité de FAD2 sur l'efficacité de FAD3 qui présente une variation qui suit le niveau d'expression d'ALA10. En effet, le ratio de des efficacités FAD2/FAD3 diminue dans le KO et augmente dans le surexpresseur comparé au WT comme nous l'avions vu dans la PC chloroplastique (encart Figure 44C). Ces variations ne sont pas dues à une limitation de l'expression de ces désaturases étant donné qu'il apparait que les gènes FAD2 et FAD3 sont légèrement plus exprimées dans les lignées mutantes que dans le WT comme cela a été mis en évidence par RTqPCR (Figure 45E). Cette analyse conforte donc l'idée qu'ALA10 a une action qui se situe, métaboliquement parlant, entre FAD2 et FAD3.

c. Analyse par BiFC de l'interaction de ALA10 avec FAD2

ALA10 semble donc agir en aval de FAD2 et en amont de FAD3, sa présence et à plus forte raison sa surexpression amenant à un détournement de la PC enrichie en 18:2 de FAD3. Sachant qu'il a récemment été montré que FAD2 et FAD3 peuvent former des homo/hétérodimères, et que cette

forme hétérodimerique pourrait canaliser la production de PC 18:3 à partir de la PC 18:1 sans relargage de PC18:2 (Lou et al., 2014), nous nous sommes interrogés sur la possibilité qu'ALA10 pourrait interagir avec FAD2 ou avec FAD3 déstabilisant cette canalisation du flux de PC vers la forme 18:3. Nous avons donc analysé l'interaction de ces protéines par BiFC en protoplaste de feuilles, comme décrit précédemment pour les ALIS. Nous avons analysé l'interaction de FAD2 avec FAD3 qui conformément aux résultats de Lou et al 2014, s'est avéré positive et a permis de confirmer que les deux protéines chimériques étaient bien exprimées dans ce système. Le signal YFP pour cette interaction s'est révélé être localisé dans les endomembranes de façon relativement localisée comme le montre la présence de zones où le signal est plus intense (Figure 46A). Nous avons ensuite analysé l'interaction d'ALA10 avec ces deux protéines, et nous avons détecté un signal d'interaction pour FAD2 contre ALA10 dans les deux orientations de la YFP. Ce signal apparait de façon extrêmement localisé soit à proximité des formes globulaires isolées dans le cytosol. Les deux types d'observations ont été observées pour les deux combinaison ALA10/FAD2. Cependant sur plus de trois expériences indépendantes totalisant plus d'une cinquantaine d'observations, nous n'avons jamais observé de signal positif pour l'interaction d'ALA10 avec FAD3 (Figure 46). Il semble donc qu'ALA10 interagisse spécifiquement avec FAD2 mais pas avec FAD3. Une conséquence de cette interaction pourrait être d'une part la déstabilisation du complexe FAD2/FAD3 qui permettrait de diminuer la canalisation du flux de PC entre ces deux protéines, ralentissant ainsi la désaturation vers la forme 18:3. D'autre part, ALA10 ayant pour fonction le flip de lipide, le flip de la PC18:2 empêcherait sa prise en charge par FAD3 ce qui permettrait la maintenance d'un pool de PC18:2 au sein des endomembranes.

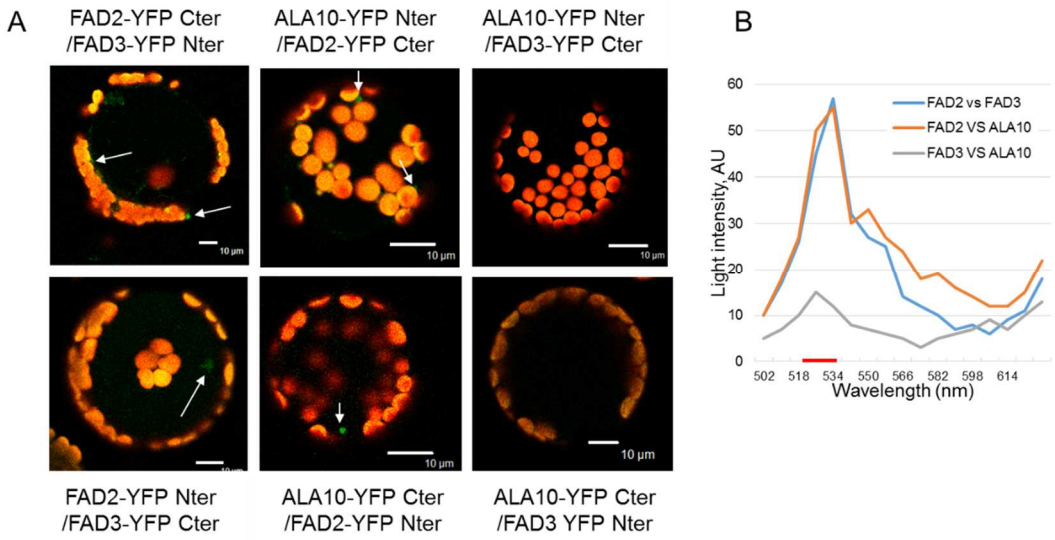


Figure 46 : Analyse de l'interaction d'ALA10 avec FAD2 et FAD3 par BiFC. *A. Protoplastes de feuilles d'Arabidopsis cotransfectés avec ALA10, FAD2 et FAD3 fusionnés avec les parties Nter ou Cter de la YFP. Les images présentées sont les superpositions des signaux YFP en vert et de l'autofluorescence de la chlorophylle en rouge. Le signal YFP est détectable uniquement pour FAD2 contre FAD3 et pour FAD2 contre ALA10 dans les deux orientations de la YFP (flèches blanche) N>3 dans chaque cas. Aucun signal n'a jamais été détecté pour ALA10 contre FAD3 (n>50). Barre d'échelle 10µm. B Spectre d'émission représentatif des protoplastes en unités arbitraires ici ALA10-YFP Nter/FAD2-YFP Cter, et ALA10-YFP Nter/FAD3-YFP Cter.*

4. Discussion

ALA10 est une ATPase de type P_4 ; cette famille multigénique regroupe différentes protéines décrites comme étant des flippases de phospholipides. Nous avons montré qu'ALA10 est présente dans les endomembranes, où elle interagit avec ALIS1 ou ALIS5. Comme les autres ALA, lorsqu'elle est exprimée

seule, ALA10 fusionnée en Cter ou en Nter avec la GFP est localisée dans le RE, alors que lorsqu'elle est exprimée avec une ALIS sa localisation est modifiée. En effet dans les tissues chlorophylliens, quand ALA10-GFP est exprimée avec une ALIS-CFP (fusions en Cter), ALA10-GFP et l'ALIS-CFP se trouvent localisées dans des domaines des endomembranes spécifiques en fonction de l'ALIS. Avec ALIS1, cette localisation semble être à proximité directe et/ou dans la membrane plasmique, alors qu'avec ALIS5 ALA10 est localisée à proximité des chloroplastes.

Dans les tissus contenant des chloroplastes, ALA10 semble être liée à la synthèse des galactolipides. En effet les analyses lipidiques effectuées sur les différentes lignées mutantes pour ALA10, font apparaitre qu'ALA10 accroit le ratio MGDG/PC. Ce rôle dans la synthèse des galactolipides est appuyé par le fait qu'ALA10 est surexprimée lors du traitement des plantes à la Galvestine-1 qui inhibe la synthèse du MGDG. De plus lors de ce traitement, le ratio MGDG sur PC est clairement déficient dans le KOala10. Il semble qu'ALA10 puisse améliorer la synthèse des galactolipides dans des conditions physiologiques de stress tel que la croissance au froid. Nous avons en effet observé une corrélation entre le ratio MGDG/PC, l'expression d'ALA10 et la croissance lors de cultures à 10°C. Chez *Arabidopsis*, d'autre ALAs ont été montrées importantes lors de la croissance à température restrictive (Gomès et al., 2000; Lopez-Marques et al., 2012; McDowell et al., 2015; McDowell et al., 2013). Cependant aucune ALA n'a été décrite comme stimulant la synthèse des galactolipides, il a même été montré que le double KO ALA6/ALA7 présente une augmentation de la teneur en DGDG dans le tube pollinique (McDowell et al., 2015). Au vu du fait que chacune des ALA peut interagir avec plusieurs ALIS comme montré ici pour ALA10, et que la localisation des ALA est dépendante des ALIS, il pourrait exister une compétition des ALA pour les ALIS. En fonction de l'expression des ALA et des ALIS, il se pourrait que cette compétition résulte en différentes localisations et activités des flippases au sein des endomembranes. En d'autres termes, l'expression différentielle des ALA et des ALIS dans les différents tissus pourrait amener à une localisation différente de ces protéines en fonction du tissu, du stade de développement et du stress subi par la plante. Cela rend plus complexe l'analyse de la localisation et l'interprétation des phénotypes lipidiques des plantes mutantes pour ces protéines.

Nos résultats indiquent que l'effet d'ALA10 sur la synthèse du MGDG se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, ALA10 interagit avec FAD2 ce que nous avons observé par BiFC et FAD2 interagit avec FAD3 comme l'a récemment démontré (Lou et al., 2014) ce que nous avons également observé. Ainsi, l'interaction d'ALA10 avec FAD2 pourrait déstabiliser le complexe FAD2/FAD3 perturbant de ce fait le flux de PC entre ces deux désaturases provoquant le relargage de PC riche en 18:2 lors du processus de désaturation. Par ailleurs, l'interaction de FAD2 avec ALA10 suggère que ces deux protéines ont le même substrat lipidique. Comme FAD2 désature les acides gras 18:1 préférentiellement sur la PC ALA10 utilise probablement préférentiellement le produit ou le substrat de FAD2, la PC riche en 18:2, ce qui est cohérent avec les résultats de Poulsen et al montrant qu'ALA10 flippe préférentiellement la PC. Cette sélection d'espèces de PC peut être liée à une sélectivité de l'enzyme ou plus probablement à sa localisation dans des domaines riches en PC18:2 due à sa proximité avec FAD2. A partir de cette interaction nous pouvons spéculer qu'ALA10 transporte la PC riche en 18:2 d'un feuillet à l'autre du réticulum.

L'analyse lipidique des cals issues des différentes lignées, suggère qu'ALA10 affecte la désaturation à la fois par FAD2 et par FAD3 sans réduction de l'expression de ces protéines. Cependant, cette inhibition ne corrèle pas avec l'expression d'ALA10, alors que le ratio de leurs efficacités semble présenter une corrélation avec l'expression d'ALA10; en d'autres mots c'est l'équilibre FAD2/FAD3 qui

semble perturbé par ALA10. Cela suggère qu'ALA10 intervient entre FAD2 et FAD3 en flippant la PC18:2. Par similarité avec les autres ALAs, et au vu de l'interaction d'ALA10 avec FAD2 qui montre que les parties Cter de ces deux protéines sont du même côté du RE, il semblerait que ce transfert se fasse depuis le feuillet lumenal vers le feuillet cytosolique du RE. Comme FAD2 et FAD3 sont des protéines transmembranaires, l'élaboration d'un modèle nécessite une orientation correcte des activités de chacune de ces protéines, par exemple: déterminer dans quel feuillet est la tête polaire des lipides désaturés par FAD2 et FAD3. En dépit de la présence d'un centre Fe-Fe et trois HIS box du côté cytosolique qui suggère qu'une partie du transfert d'électron se fasse du côté cytosolique, le site de liaison du lipide est encore sujet à débat. Une étude par mutagenèse d'une désaturase proche de FAD2 suggère qu'une portion du troisième segment transmembranaire qui se trouve être dans le feuillet lumenal est importante dans la sélectivité de l'acyl. Nous proposons donc que l'interaction d'ALA10 avec FAD2 modifie l'équilibre FAD2/FAD3 au détriment de l'activité de FAD3 mais le mécanisme reste encore incertain (Broadwater et al., 2002). Nous faisons ainsi l'hypothèse qu'ALA10 prévienne la désaturation par FAD3 soit par déstabilisation du complexe FAD2/FAD3, soit par le fait que la PC18:2, une fois transportée, se trouve dès lors inaccessible à FAD3, ce qui amènerait à un enrichissement du feuillet cytosolique du RE en PC18:2.

Ensuite, ALA10 modifie la nature du lipide transféré au chloroplaste. L'analyse lipidique des chloroplastes purifiés des différentes lignées mutantes pour ALA10 montre une augmentation de la teneur en PC18:2 et une diminution de la PC 18:3 quand ALA10 est surexprimée. Plusieurs ATPases de type P_4 ont été décrites comme ayant un rôle dans le trafic lipidique (études regroupées par Coleman et al., 2013). En générant une distribution asymétrique des lipides au sein des membranes, elles favoriseraient la courbure et la fission des membranes ce qui peut être amplifié par le transfert de phospholipides poly-insaturés (Pinot et al., 2014). De la meme manière, ALA10, en générant un enrichissement en PC désaturée par FAD2 dans le feuillet cytosolique du RE, pourrait favoriser le transfert de PC18:2 vers le chloroplaste. Cette hypothèse est confortée par la localisation d'enzymes comme les phospholipases A et les acyl-CoA synthétases au niveau des sites de contact entre RE et chloroplaste, permettant une canalisation spécifique d'un pool de lyso-PC et d'acyl-CoA entre ces membranes avant la reconstitution de la PC dans la membrane externe du chloroplaste par les lysoPC:acyl-CoA acyltransferases. Cette hypothèse est aussi en accord avec la localisation des LACS et des lysoPC:acyl-CoA acyltransferases, et de l'enrichissement en PC dans le feuillet externe de cette membrane.

Enfin, la PC transférée au chloroplaste devrait amener à l'augmentation de la production de MGDG. Du fait de la stabilité entre les différentes lignées des formes de MGDG (eucaryote et procaryote), il apparait que cette augmentation de la synthèse de MGDG ne soit pas le fait d'un apport supplémentaire de DAG eucaryote. C'est-à-dire qu'il ne s'agirait pas d'une augmentation de la quantité de substrat disponible pour cette enzyme, mais plus vraisemblablement d'une augmentation de l'activité de MGD1. Attendu qu'il n'y a pas d'augmentation de l'expression des MGDs dans les différentes lignées, il semblerait qu'il s'agisse d'une augmentation de l'activité enzymatique de ces protéines. L'activation cytosolique de phospholipases D pourrait entrainer la conversion de la PC chloroplastique en AP, activateur principal de la synthèse du MGDG dans les tissus photosynthétiques. PLDγ1 pourrait alors être une phospholipase D candidate possible puisqu'elle est parmi les gènes les mieux coexprimés avec ALA10. On trouve PLDγ1 prédite comme étant exclue du RE et de ce fait probablement cytosolique, possiblement associée à la membrane plasmique ou au chloroplaste lorsqu'on recherche *in silico* sa localisation (SUBA3) (Tanz et al., 2013). Prises dans leur ensemble, ces

données nous permettent de proposer un modèle de travail dans lequel la PC néosynthétisée 18:1 est désaturée par FAD2, ensuite elle peut être flippée à proximité des chloroplastes par ALA10 en association avec ALIS5, la rendant de ce fait inaccessible à FAD3. Cela entrainerait l'augmentation de la teneur en PC18:2 au niveau du feuillet cytosolique du RE et permettrait son transfert vers le chloroplaste. Une fois transférée, cette PC18:2 pourrait être convertie en AP, lequel pourrait, après son transfert à la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste, activer MGD1 (Figure 47).

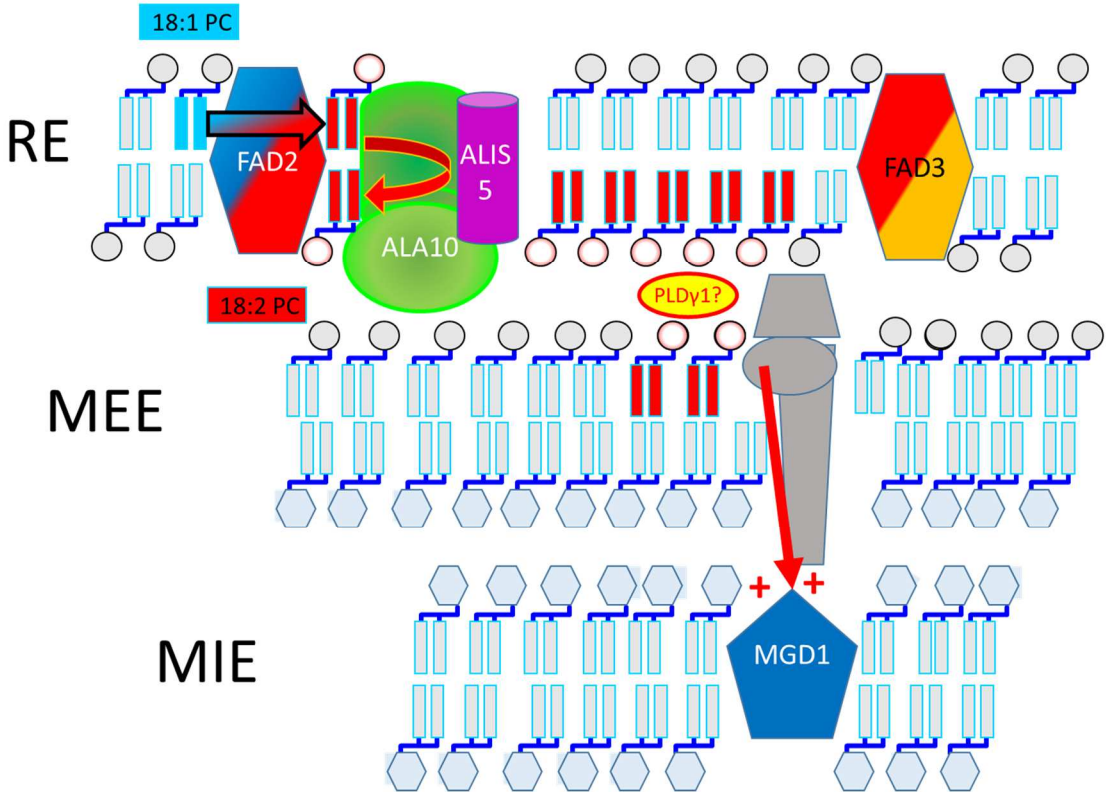


Figure 47 : Modèle schématique du fonctionnement d'ALA10 en lien avec la synthèse des galactolipides. *La PC 18:1 néo synthétisée dans le RE, est désaturée par FAD2, puis elle est flippée par ALA10, ce qui la rend inaccessible a FAD3. Cela entraine son accumulation dans le feuillet cytosolique du RE et favorise son transfert vers le chloroplaste ou elle peut être convertie en AP, possiblement par PLDγ1, qui peut à son tour activer MGD1 après son transfert à la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. La flèche rouge et les signes + indiquent un transfert et une activation respectivement. RE: réticulum endoplasmique; MEE: membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste, MIE: membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. RE: réticulum endoplasmique, MEE: membrane externe de l'enveloppe, MIE: membrane interne de l'enveloppe*

En conclusion, ce travail montre qu'ALA10 participe à la régulation de la synthèse des galactolipides dans les feuilles. Des modifications de l'expression d'ALA10 affectent d'abord la désaturation de la PC en perturbant l'équilibre entre FAD2 et FAD3 dans le RE, qui entraine une modification de la PC chloroplastique. Enfin, ALA10 accroit le ratio MGDG/PC et ce de façon plus marquée dans les conditions où la synthèse de MGDG est inhibée par la Galvestine-1, ou lors de la croissance à température restrictive. Il semblerait que cet accroissement de la synthèse de MGDG soit le fait d'une activation de MGD1 par l'AP. Dans les tissus contenants des chloroplastes, ALA10 interagit avec ALIS1 et ALIS5 ce qui amène à une localisation différente de ces tandems: membrane plasmique avec ALIS1 et RE à proximité des chloroplastes avec ALIS5. Ces localisations différentes suggèrent différentes fonctions d'ALA10 qui pourraient être complémentaires ou compétitives. Avec ALIS1, ALA10 pourrait avoir un rôle au niveau de la membrane plasmique comme le suggère les travaux de (Poulsen et al., 2015). Avec ALIS5, ALA10 a probablement une fonction en lien avec la biogénèse des chloroplastes. La disponibilité relative d'ALA10, ALIS1 et ALIS5 semble être un facteur déterminant dans le contrôle de ces différentes fonctions. Dans leur ensemble, ces données présentent ALA10

comme étant multifonctionnelle et participant à de complexes voies de régulations, connectant le développement des membranes non plastidiales avec la biogénèse des chloroplastes. La caractérisation de ses partenaires et de son activité en fonction de ces interactions semble être un point crucial dans la compréhension de ces mécanismes.

Chapitre II

Le rôle des ALIS dans la fonction d'ALA10

ALA10 interagit avec ALIS1 et ALIS5. L'interaction avec l'une ou l'autre des ALIS engendre, dans les cellules du mésophylle, une localisation différente en fonction de l'ALIS: dans le RE à proximité des chloroplastes avec ALIS5 et au niveau de la membrane plasmique avec ALIS1. Nous avons voulu déterminer si l'interaction d'ALA10 avec ALIS1 ou ALIS5 pouvait également avoir des conséquences sur la fonction d'ALA10 probablement liée à la localisation différentielle des complexes.

1. Expression des ALA et des ALIS.

Pour que deux protéines interagissent ensemble, il faut qu'elles soient présentes au même moment dans la même cellule. Nous avons donc d'abord comparé l'expression des gènes de chacune des ALA et des ALIS dans différents tissus au stade à 17 jours de croissance sur terre en jour continu (Figure 48). Du fait de l'importance d'ALA10 dans la synthèse des galactolipides, nous avons ajouté à cette analyse d'expression de gènes les données d'expression des gènes des trois MGDG synthases. Cette analyse bio-informatique a été effectuée grâce à l'outil EFP browser du site de l'université de Toronto BAR (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi; *(Toufighi et al., 2005)* regroupant les données de puces à ADN Affymetrix disponibles pour *Arabidopsis thaliana*. Cette première analyse révèle qu'ALA10 comparée aux autres ALA et aux ALIS a un niveau d'expression moyen qui est très variable d'un tissu à l'autre. Elle est plus exprimée dans la 4^{e} feuille et moins exprimée dans la très jeune (12^{e}) feuille. Il apparait aussi qu'ALIS1 est, de très loin, la plus fortement exprimée des ALIS et qu'ALIS5 est peu exprimée. Par ailleurs, comme cela a été décrit (Boudière et al., 2014), MGD1 est la MGDG synthase la plus fortement exprimée et son expression est relativement stable au cours du développement de la feuille. Pour évaluer dans quelle mesure l'expression d'ALA10 était plus variable que celle des autres ALA, ALIS et MGD, nous avons comparé les données normalisées en rapportant l'expression de chaque gène à l'expression médiane de ce gène sur l'ensemble des études réalisées incluant les études de réponse aux stress biotiques et abiotiques. De tous les gènes sélectionnés dans notre analyse, il apparait que l'expression d'ALA10 est celle qui varie le plus (Figure 48).

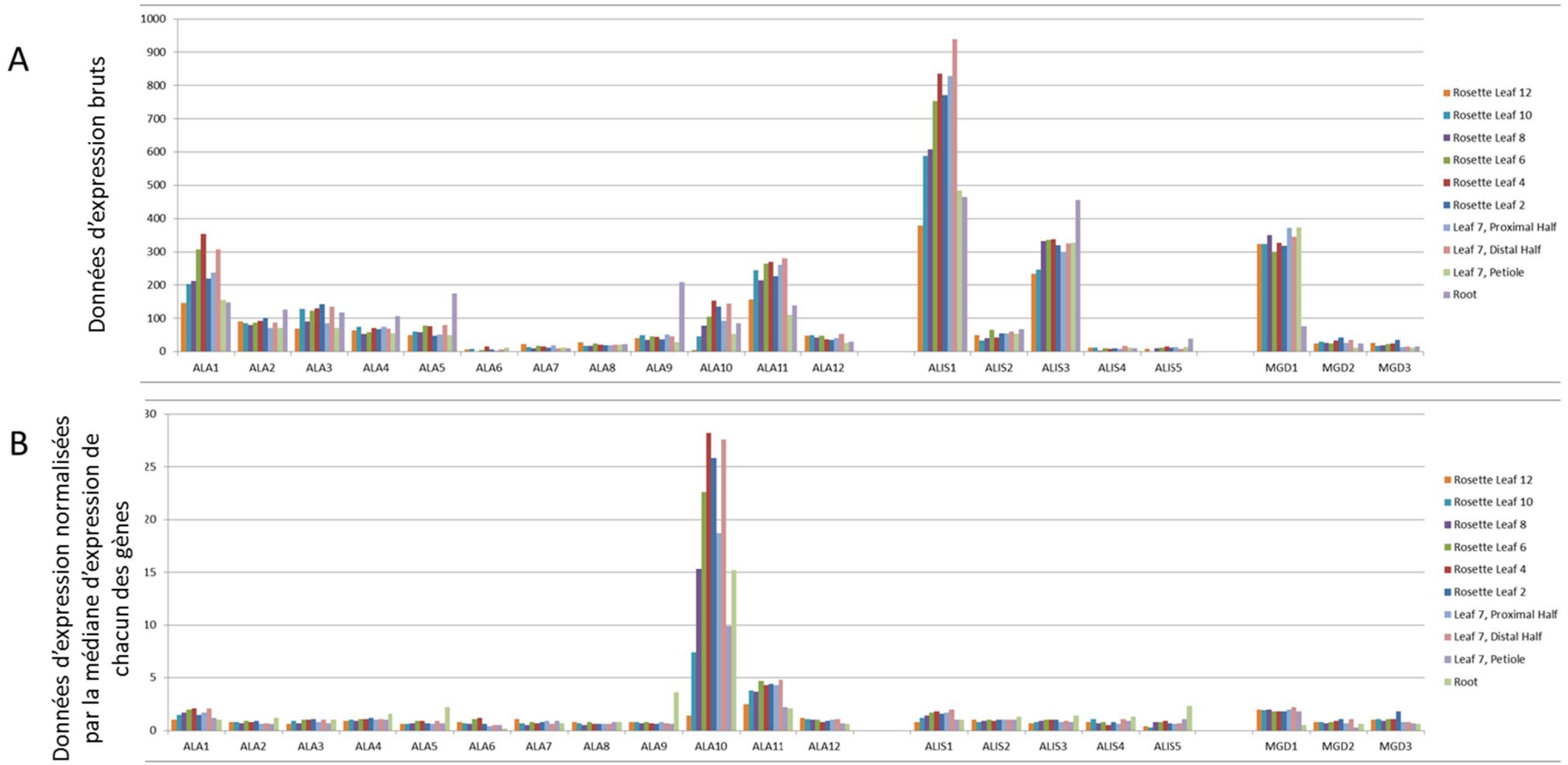


Figure 48 : Analyse de l'expression des ALA, ALIS et MGD en fonction du tissu sur une même plante à 17 jours de croissance. *Données correspondant aux 12ème, 10ème, 8ème, 6ème, 4ème, et 2ème feuilles, et racines entière. A. Données d'expression brute. B. Analyse de la variabilité d'expression dans les différents tissus par normalisation des données brutes par la médiane de l'expression de chacun des gènes dans toutes les conditions testées incluant les données relatives au développement des graines et aux différents stress.*

Pour savoir dans quelle mesure les gènes codant pour les différentes ALA, ALIS et MGD pouvaient être coexprimés dans les différents tissus, nous avons comparé leur expression avec l'outil E-southern de BAR (http://bar.utoronto.ca/). Avec cet outil, l'expression des différents gènes est regroupée hiérarchiquement automatiquement en fonction de la corrélation de leur expression, déterminée selon la corrélation métrique de similarité centrée (corrélation de Pearson). Nous avons ainsi remarqué que le profil d'expression d'ALA10 dans les différents tissus est globalement proche de celui d'ALIS1 et plus éloigné de celui d'ALIS5 (49).

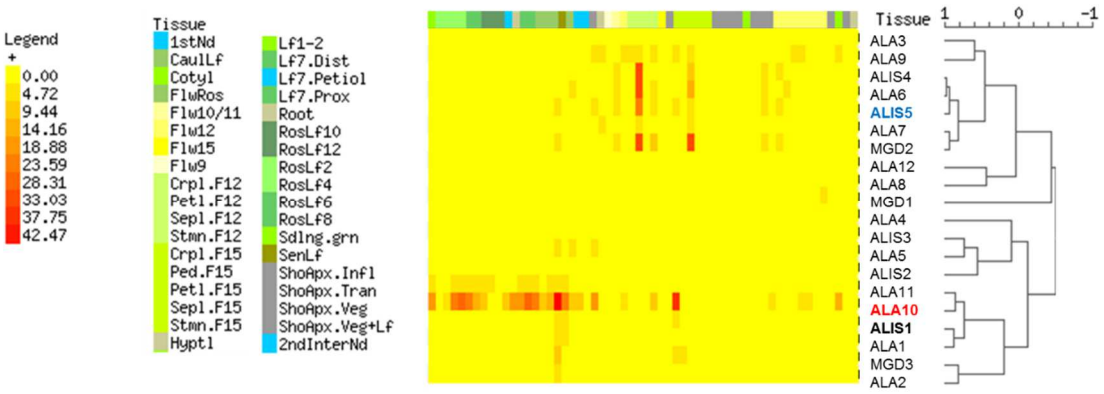


Figure 49 : E-southern, analyse d'expression des ALA, ALIS et MGD en fonction du tissu. *Données obtenues par analyse bio-informatique sur BAR (http://bar.utoronto.ca/; (Toufighi et al., 2005). Les corrélations sont calculées par corrélation métrique de similarité centrée (Corrélation de Pearson). L'expression des gènes est normalisée par rapport à la médiane des expressions pour le gène correspondant dans toutes les conditions testées, la couleur jaune signifie une absence d'expression, plus la couleur tend vers le rouge plus le gène est exprimé, la valeur absolue de l'expression est donnée par l'échelle de valeur à gauche. Le regroupement des gènes en fonction de leur corrélation d'expression ainsi que la mesure de ces corrélations est donné (à droite). La quantification de la corrélation entre deux gènes est donnée par la hauteur du nœud reliant ces deux gènes. Une corrélation de 1 signifie une coexpression parfaite, une corrélation de -1 signifie une anti corrélation totale. Abréviations: 1st Nd: 1er nœud, CaulLF: feuille de cauline, Cotyl: Cotylédon, FlwRos: Rosette entière après transition florale, Flwn: fleur entière au stade n feuilles, Crpl: Carpel, Petl: Pétal, Sepl: Sépal, Stmn: Stamène, Ped: Pédicelle, Fn: Nombre de feuilles de la rosette au moment où la fleur a été récoltée, Hypl: Hypocotyle, Lfn: feuille numéro n, Dist: moitié distale, Prox: moitié proximale, Petiol: pétiole, Root: Racine, RosLfn: Feuille de rosette numéro n, Sdlg,gr: semis partie verte, SenLf: feuille en sénescence, ShoApx: Apex, Infl: inflorescence, Tran: Transition foliaire, Veg: stade végétatif, Veg+LF, Apex + jeunes feuilles, 2nd InterNd: second internoeud.*

Ces données ont été obtenues sur des plantes cultivées en conditions de culture favorables non stressées. Or nous avons vu précédemment, qu'en condition contrôle standard, les modifications de l'expression d'ALA10 (KO et surexpresseur) n'avaient que peu d'effet sur la croissance des plantes. Par contre, lors d'un stress au froid, nous avons pu observer un phénotype de croissance sur les différentes lignées mutantes pour ALA10 (Voir Résultats chapitre I) suggérant un rôle d'ALA10 dans la réponse au froid. Pour évaluer l'importance de l'expression d'ALA10, ALIS1 et ALIS5 dans la réponse au froid, nous avons analysé les données d'expression relatives au stress au froid disponibles sur BAR. Le traitement au froid a été effectué sur des plantes de 18 jours cultivées en hydroponique en condition favorable, l'exposition au froid est faite en plaçant les plantes sur de la glace pilée (exposition à une température de 0°C). Ces données montrent que dans ces conditions, à l'exception d'ALA10 et d'ALIS5, toutes les ALA et les ALIS ont une expression plus induite par le stress au froid dans les racines que dans les parties aériennes (Figure 50). D'autre part, on voit qu'ALA10, et dans une moindre mesure ALIS5, sont très fortement surexprimées dans les parties aériennes aux temps 6 et 24h de l'exposition au froid. Cependant cette induction est extrêmement variable au cours du temps: pour ALA10, induction d'un facteur 7 et 10 en comparaison de la condition contrôle à 6 et 24h après le début du traitement et une légère répression à 30min, 1h et 12h (Figure 50). De plus lorsqu'on traite ces données avec l'outil E-southern afin de déterminer quels sont les gènes présentant la plus grande corrélation d'expression,

on observe que l'expression d'ALA10 se trouve proche de celle d'ALIS5 et plus éloignée d'ALIS1 (Figure 51). En résumé, ces résultats semblent indiquer une augmentation particulière et relativement similaire de l'expression d'ALA10 et ALIS5 en réponse au froid dans les feuilles.

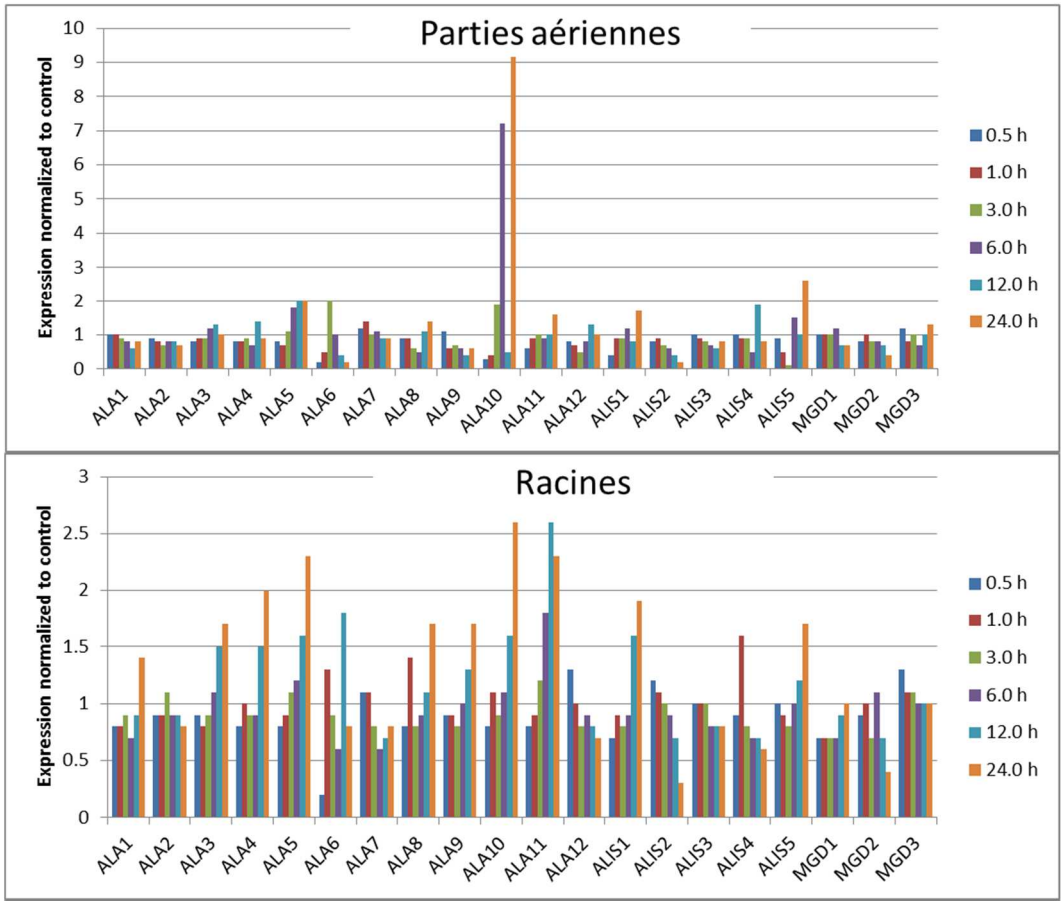


Figure 50 : Analyse de l'induction de l'expression des ALA, ALIS et MGD par le froid au cours du temps dans les parties aériennes et les racines*. Les données d'expression au froid sont normalisées par rapport à l'expression du gène en condition contrôle au même temps. Données issues de BAR (http://bar.utoronto.ca/; (Toufighi et al., 2005).*

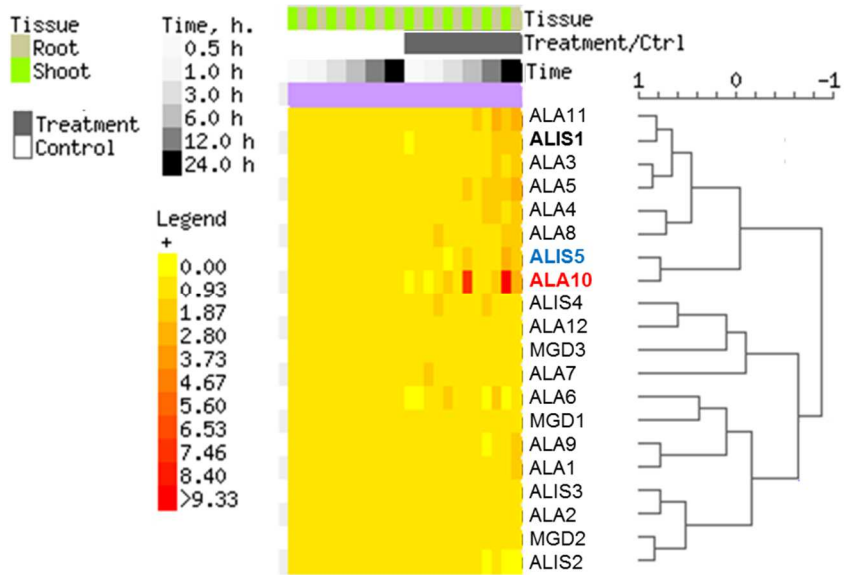


Figure 51 : E-southern, analyse d'expression des ALA, ALIS et MGD lors de l'exposition des plantes au froid. Données obtenues par analyse bio-informatique sur BAR (http://bar.utoronto.ca/(Toufighi et al., 2005). L'expression des gènes est

normalisée par rapport à la médiane des expressions pour le gène correspondant dans la condition contrôle la couleur jaune signifie une absence d'expression, plus la couleur est tend vers le rouge plus le gène est exprimé, la valeur absolue de l'expression est donné par l'échelle de valeur à gauche. Le regroupement des gènes en fonction de leur corrélation d'expression ainsi que la mesure de ces corrélations est donné (à droite). La quantification de la corrélation entre deux gènes est donnée par la hauteur du nœud reliant ces deux gènes. Une corrélation de 1 signifie une coexpression parfaite, une corrélation de -1 signifie une anti corrélation totale. Expression (jaune, orange, rouge) normalisée par rapport.

Les données transcriptomiques répertoriées sur le site BAR permettent par ailleurs de suivre l'expression génique au cours du cycle jour/nuit. Les données sur des feuilles âgées de 29 et 35 jours montrent que les gènes codant pour ALA10 et ALIS5 ont une expression dépendante du rythme circadien (Figure 52). En effet, le gène codant pour ALA10 est exprimée fortement en début de nuit et son expression s'éteint au lever du jour. Le gène codant pour ALIS5, quant à lui, semble suivre un schéma d'expression similaire mais son optimum d'expression précède de quelques heures celui codant pour ALA10. L'expression du gène codant pour ALIS1 dans ces conditions présente une légère augmentation 4h après la transition jour/nuit (Figure 52). Ainsi il semblerait que dans les feuilles, le complexe ALA10-ALIS5 soit favorisé en tout début de nuit et le complexe ALA10-ALIS1 le soit plus tardivement.

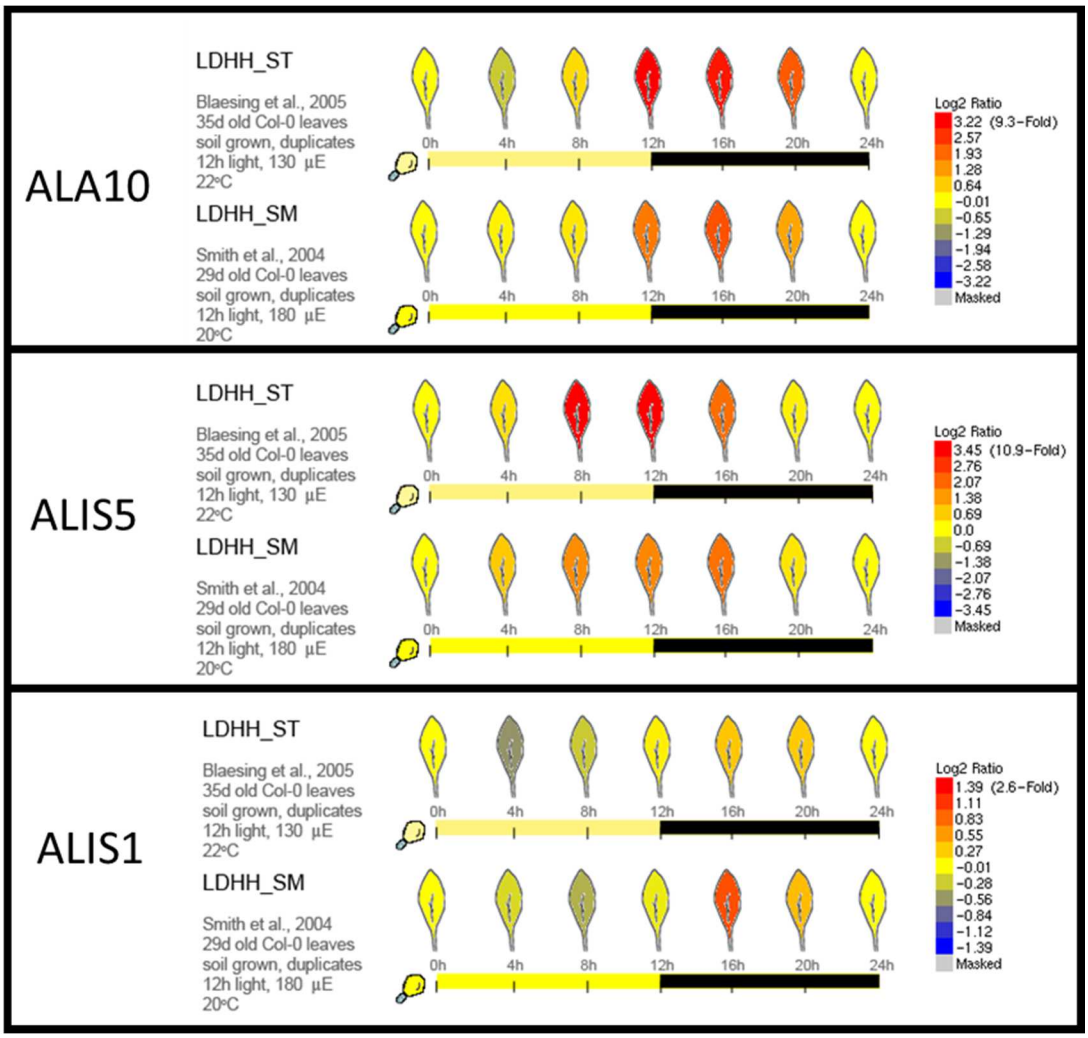


Figure 52 : Analyse de l'expression d'ALA10, ALIS5 et ALIS1 au cours du cycle circadien. *Mesures effectuées sur les feuilles de rosette de 35 (lignes supérieures) et 29 jours (lignes inferieures) cultivées avec une photopériode de 12h de jours suivie de 12h de nuit. Les deux jeux de données sont tirés de (Blaesing et al 2005 et Smith et al 2004). Les données sont présentées en Log2 du ratio d'expression entre la condition présentée et la première mesure (0h).*

Cette analyse fait ressortir que, sur des plantes de 17 jours, le gène codant pour ALA10 est particulièrement exprimé dans des feuilles déjà développées avec un niveau d'expression plus proche

de celui du gène codant pour ALIS1 que de celui du gène codant pour ALIS5 et que son niveau d'expression est très variable, suggérant une réponse aux stimulus environnementaux. En réponse au froid, le profil d'expression du gène codant pour ALA10 est plus proche de celui de ALIS5 que de celui de ALIS1. Cet effet du froid dans les plantes de 18 jours est particulièrement intense dans les feuilles, comparées aux racines. D'autre part, les gènes codant pour ALA10, ALIS1 et ALIS5 présentent une variation d'expression au cours du cycle circadien avec un maximum en fin de journée pour ALIS5 et en début de nuit pour ALA10 alors qu'une augmentation légèrement plus tardive apparait pour ALIS1. Ces observations semblent indiquer qu'ALA10, ALIS1 et ALIS5 présentent un lien relatif à une régulation fonctionnelle dans les feuilles matures. Elles paraissent cohérentes avec l'hypothèse formulée dans le premier chapitre de la partie résultat selon laquelle ALA10 pourrait avoir une action de régulation de l'homéostasie lipidique des chloroplastes dont l'activité est fortement régulée par la photopériode et le rythme circadien (Browse et al., 1981; Nakamura et al., 2014a; Ohlrogge and Jaworski, 1997; Szymanski et al., 2014).

2. Observations microscopiques des plantes mutantes pour ALA10 et les ALIS

a. Observation en microscopie confocale des doubles surexpresseurs L2ALIS1 et L2ALIS5

Dans le chapitre I, nous avions observé qu'ALA10-GFP coexprimée transitoirement en protoplaste avec ALIS1-CFP présente une localisation à proximité ou sur la membrane plasmique alors qu'exprimée avec ALIS5-CFP, les deux protéines colocalisent dans le RE à proximité directe de chloroplastes. Nous avons voulu vérifier ces résultats en plantes entières, et étudier l'impact de la surexpression d'ALA10 avec une ALIS. Pour cela nous avons transformé des plantes L2, seule lignée permettant l'observation d'ALA10-GFP en microscopie confocale, avec des constructions permettant l'expression d'ALIS1 ou ALIS5 fusionnées à la CFP, nommées respectivement L2ALIS1 et L2ALIS5. Il est à noter que l'obtention de ces lignées s'est faite tardivement au cours de ma thèse, ces observations ont été faites sur des transformants de deuxième génération (T2), le but original étant de confirmer l'expression des transgènes CFP avant fixation pour la microscopie électronique. La détection de la CFP, de la GFP et de la chlorophylle a été faite avec des fenêtres de détection de 432-475, 501-521, et 666-683 nm.

Nous avons observé les parties aériennes des plantules issues de ces deux lignées en microscopie confocale au terme de 15 jours de croissance. Les signaux correspondant à ALA10-GFP et ALIS1-CFP sont très faibles dans la lignée L2ALIS1, ce qui suggère une très faible expression des protéines de fusion. Le niveau de GFP observée dans la L2ALIS1 est plus faible que celui de la L2 seule. Cela suggère que, dans un tissu où normalement le complexe ALA10-ALIS1 est peu abondant, il existe une régulation post-transcriptionnelle sur la protéine ALA10. Dans le mésophylle de la L2ALIS1, nous avons observé ALA10-GFP et ALIS1-CFP au niveau de ce qui semble être la membrane plasmique alors que dans la L2 avec l'expression endogène naturelle d'ALIS1, ALA10-GFP est localisée à proximité du chloroplaste. La localisation supportée par l'expression additionnelle d'ALIS1-CFP dans un tissu vert, apparait comme étant ponctuelle et non homogène sur toute la membrane plasmique (Figure 53). Cela suggère que le complexe ALA10-ALIS1 a une localisation qui est concentrée en certains points de la membrane plasmique. Cette localisation ponctuelle pourrait être le fait de l'interaction d'ALA10 avec le cytosquelette, comme c'est le cas pour d'autres ATPase de type P_4 (Verhulst et al., 2010; Warren et al., 2002)(voir Synthèse bibliographique IV.2.c). De plus, ces observations ont révélé une proportion non négligeable de chloroplastes qui semblent présenter des anomalies de développement: ils apparaissent plus petits que la majorité des chloroplastes et sont sphériques contrairement aux

chloroplastes qui ont classiquement une forme ovoïde aplatie. La localisation inhabituelle d'ALA10 dans ce tissu dans ces conditions pourrait peut-être être liée à l'anomalie des chloroplastes et au faible niveau de fluorescence d'ALA10-GFP. Il faudrait reproduire ces expériences aux générations suivantes afin de vérifier et valider ce phénotype.

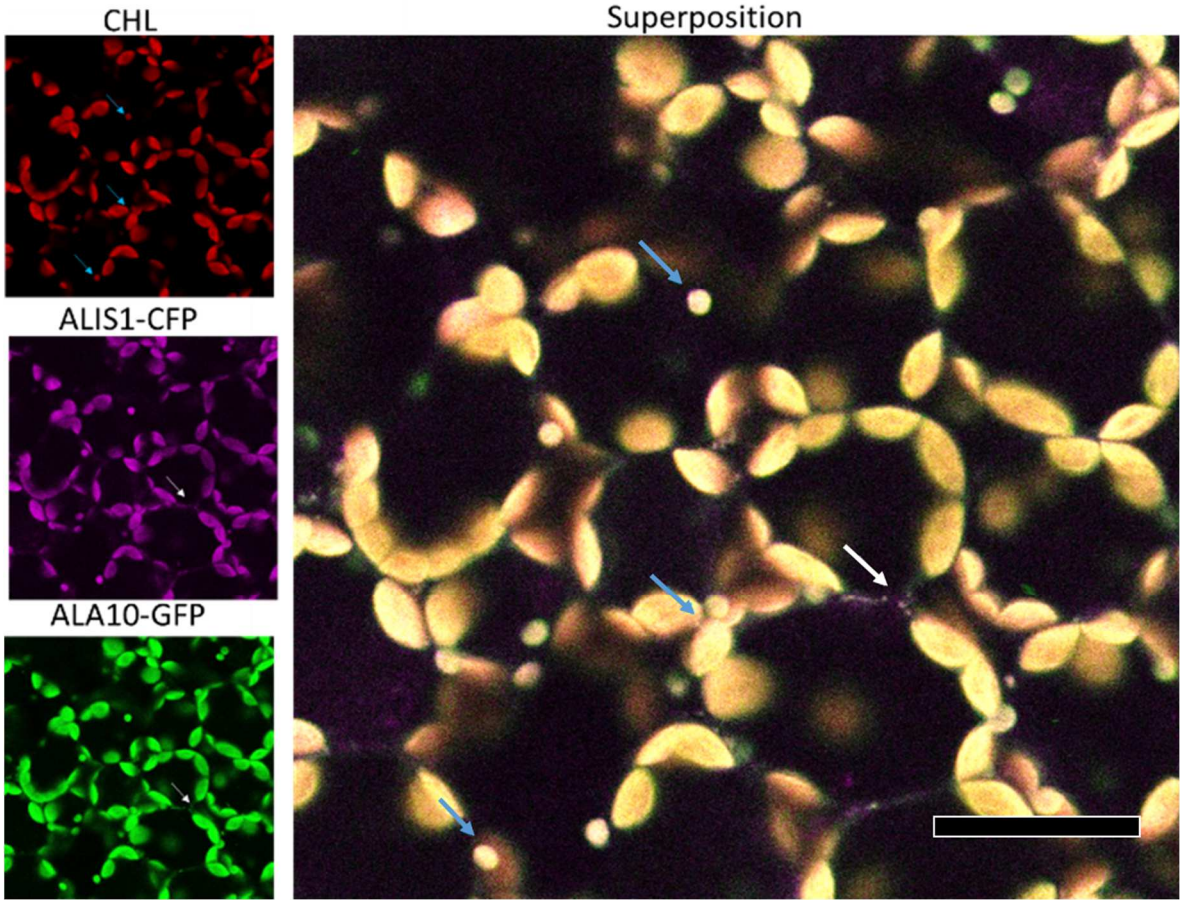


Figure 53 : Observation en microscopie confocale du mésophylle de la lignée L2ALIS1. *En rouge, l'autofluorescence de la chlorophylle (CHL), en magenta, la fluorescence de la CFP (ALIS1-CFP), en vert la fluorescence de la GFP (ALA10-GFP). La barre d'échelle représente 10µm. Sur la superposition (à droite), la flèche blanche indique la localisation des signaux GFP et CFP à proximité ou sur la membrane plasmique, les flèches bleues indiquent les chloroplastes ayant une forme inhabituelle. La faiblesse des signaux GFP et CFP nécessite d'utiliser des gains très élevés, ce qui a pour effet d'augmenter le bruit de fond des chloroplastes qui émettent de façon aspécifique dans les canaux GFP et CFP.*

L'observation de la L2ALIS5 a permis de confirmer qu'ALA10 et ALIS5 sont bien exprimés. Les signaux GFP et CFP sont plus forts que dans la L2ALIS1, le signal GFP étant proche de celui de la L2. De plus, dans les cellules du mésophylle, les fluorescences de la GFP et de la CFP sont localisées dans les endomembranes, *a priori* au niveau du RE, puisque le noyau est encerclé comme c'est le cas dans les marquages spécifiques du RE. Les signaux GFP et CFP présentent d'une part une localisation diffuse dans les endomembranes et parfois jusqu'au niveau de la membrane plasmique (Figure 54). De plus, l'intensité des deux signaux est plus forte au niveau d'amas globulaires en surface des chloroplastes, au niveau de ce qui pourrait être des sites de contact entre RE et chloroplastes. D'autre part, lors de ces observations, nous avons remarqué que l'intensité des signaux GFP et CFP et donc l'expression d'ALA10-GFP et ALIS5-CFP est plus forte lorsque les observations sont faites la nuit. Bien que le promoteur 35S soit exprimé en continu lors du cycle journalier, les signaux de fluorescence associés à ces protéine étaient faibles voire nuls pendant la première moitié de la journée, et n'était détectables qu'à partir du début de la nuit. Cette observation, qui avait déjà était faite sur la L2, suggère qu'en plus

d'être sujette à une régulation transcriptionnelle au cours du cycle journalier, ALA10 est régulée post traductionnellement au cours de la journée.

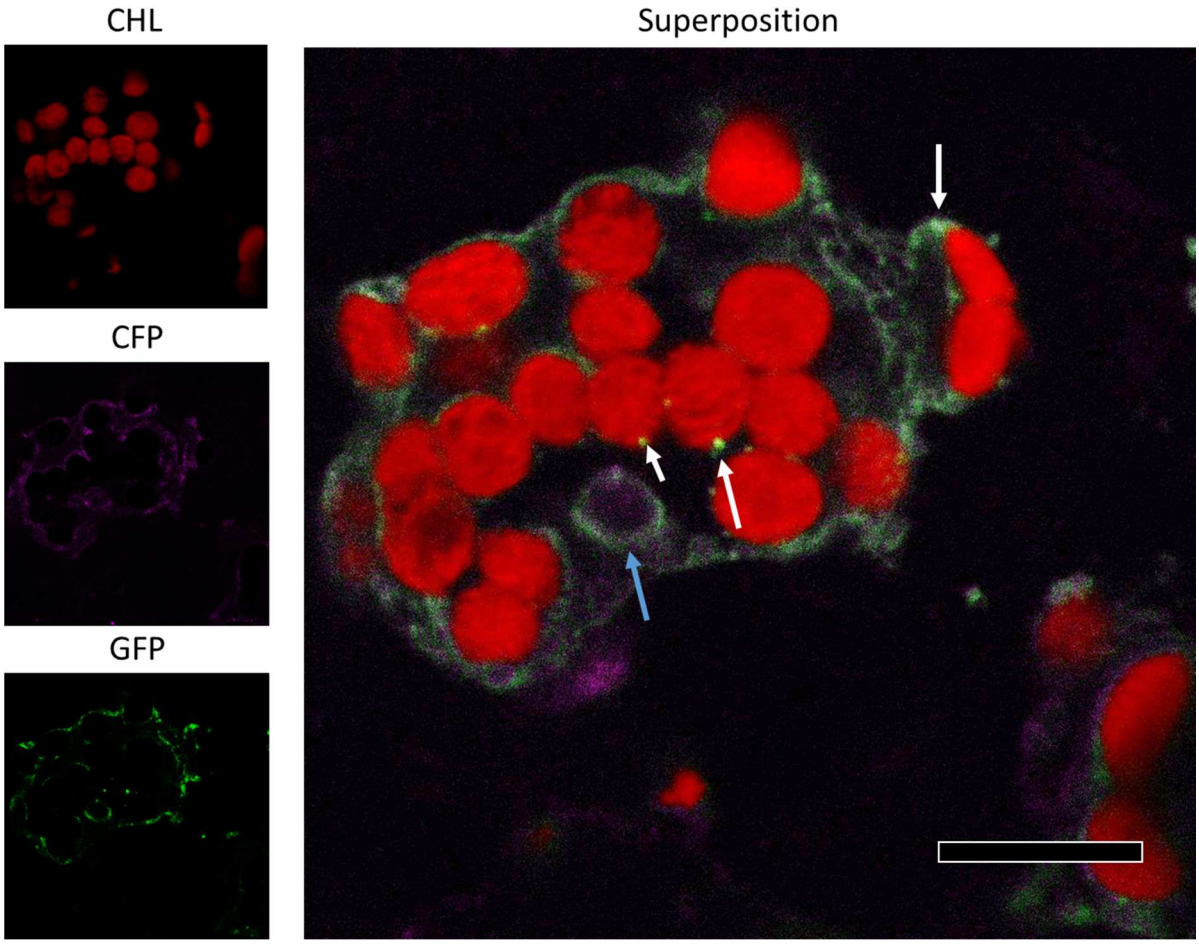


Figure 54 : Observation en microscopie confocale du mésophylle la lignée L2ALIS5. *En rouge l'autofluorescence de la chlorophylle (CHL), en magenta la fluorescence de la CFP (ALIS5-CFP), en vert la fluorescence de la GFP (ALA10-GFP). Les flèches blanches indiquent les amas globulaire ayant de fort signaux GFP et CFP, la flèche bleu indique la position du noyau La barre d'échelle représente 10µm.*

b. Observation en microscopie électronique

Suite à l'observation des différents effets d'ALA10 sur le métabolisme des lipides et la floraison en fonction de l'ALIS avec laquelle elle interagit, nous nous sommes interrogés sur les effets que pouvait avoir la surexpression ou la disruption de ces protéines sur l'ultrastructure cellulaire notamment sur les chloroplastes. Nous avons observé en microscopie électronique à transmission le mésophylle des lignées L2, KOala10, L2ALIS1 et L2ALIS5 au terme de 15 jours de culture en jours longs; l'utilisation de la L2 comme référence permettant de comparer l'effet de chacunes de ALIS. Les différents clichés obtenus nous ont d'abord interpellés du fait de la morphologie des chloroplastes des lignées L2 et L2ALIS5 qui, contrairement à toutes les autres lignées, présentent de façon quasi systématique de larges zones de stroma dépourvu de thylacoides, qui semblent résulter d'extensions de l'enveloppe des chloroplastes (Figure 55).

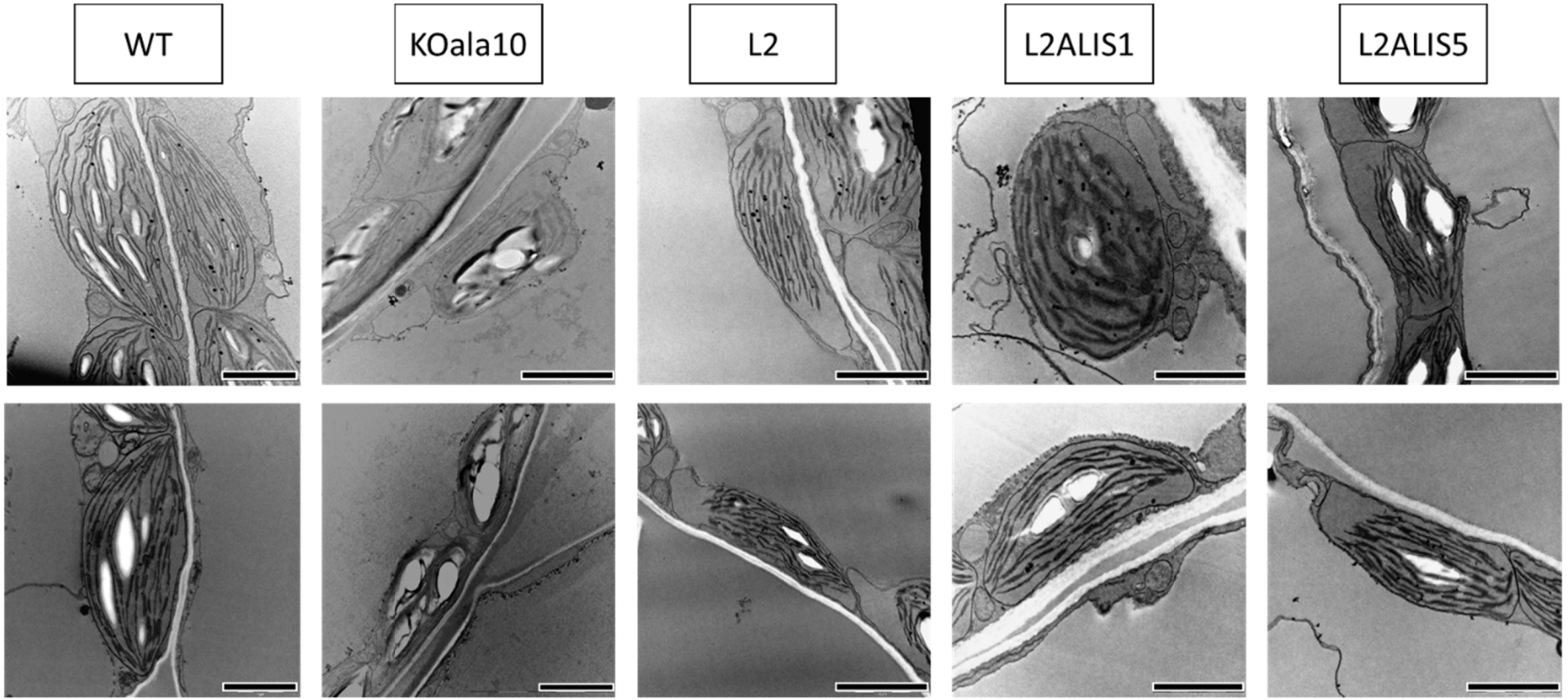


Figure 55 : Exemple d'images classiquement obtenues par l'observation en microscopie électronique des chloroplastes des lignées WT, KOala10, L2, L2ALIS1 et L2ALIS5. *Observations effectuées sur les parties aériennes au terme de 15 jours de croissance in vitro en jours longs. Pour chaque lignée, deux images représentatives sont présentées. La barre d'échelle représente 2µm.*

Les chloroplastes des différentes lignées présentent des disparités au niveau de leur taille et de leur morphologie. Pour quantifier ces différences, nous avons analysé les images au moyen du logiciel ImageJ. Nous avons déterminé la surface et le périmètre de chacun des chloroplastes ainsi que la surface des thylacoides dans les chloroplastes. Nous avons pu mettre en évidence que les chloroplastes des lignées L2ALIS1 et L2ALIS5 sont significativement plus petits que les chloroplastes des lignées sauvage et KOala10 (Figure 56.a). Par ailleurs nous avons retrouvé dans nos observations la présence de chloroplastes sphériques.

Pour quantifier les différences de morphologie des chloroplastes dans les différentes lignées, nous avons analysé le ratio de l'aire de chaque chloroplaste sur le périmètre de celui-ci (Figure 56.b). Ce ratio tend vers 0 quand la forme est allongée et augmente jusqu'à la valeur r/2 dans le cas d'un cercle parfait (r étant le rayon du cercle). Cette analyse révèle que ce ratio est significativement plus élevé dans la L2ALIS1 que dans le sauvage et la lignée KOala10. De manière intéressante, la lignée L2ALIS1 est aussi celle qui présente la plus forte disparité, ce qui semble confirmer l'existence de deux populations de chloroplastes. Par ailleurs, ce ratio est significativement plus faible dans la ligné L2ALIS5 par rapport au sauvage et au KOala10. Cela confirme les observations faites en microscopie confocale mettant en évidence une proportion élevée de chloroplastes sphériques dans la lignée L2ALIS1. Il apparait donc que la morphologie des chloroplastes dans les lignées L2ALIS1 et L2ALIS5 est modifiée, et que selon l'ALIS potentiellement surexprimée avec ALA10, l'impact sur le chloroplaste est inversé. Cette conclusion suggère qu'ALA10 assume différentes fonctions selon l'ALIS avec laquelle elle interagit et que ces fonctions affectent le développement du chloroplaste.

Pour quantifier le développement des extensions de l'enveloppe observées ci-dessus (Figure 55), nous avons choisi d'analyser le ratio de la surface totale des chloroplastes sur la surface occupée par les thylacoïdes (Figure 56.c). Cette analyse fait apparaitre, d'une part, que toutes les lignées mutantes présentent une variabilité élevée par rapport au sauvage suggérant qu'une perturbation de l'expression d'ALA10 ou des ALIS1 et 5 engendre des modifications sensibles du développement des chloroplastes. Par ailleurs, on remarque que la L2 et la L2ALIS5 présentent une augmentation significative de ce ratio par rapport au sauvage et au KOala10. Cette différence est statistiquement significative pour la L2 comparé au sauvage et au KOala10 et pour L2ALIS5 comparé au KOala10. Il se pourrait que ce phénotype soit dû au fait que le complexe ALA10-ALIS5 lorsqu'il est surexprimé, provoque un apport dérégulé de PC à l'enveloppe ce qui aurait pour effet d'induire l'extension de l'enveloppe au dépend de la production des membranes photosynthétiques. Vu que les analyses de lipides de chloroplastes issus de feuilles matures de L1 et L2 ne présentent qu'une augmentation non significative de leur teneur en PC comparé au WT (chapitre I; figure 19,), nous pouvons supposer que ce phénotype est accentué dans les feuilles en cours de développement et que l'équilibre entre synthèse d'enveloppe et synthèse de membranes photosynthétiques est rétabli par la suite. Ces observations confirment qu'ALA10 a un rôle important surtout dans des cellules en développement probablement pour moduler la teneur en PC des membranes.

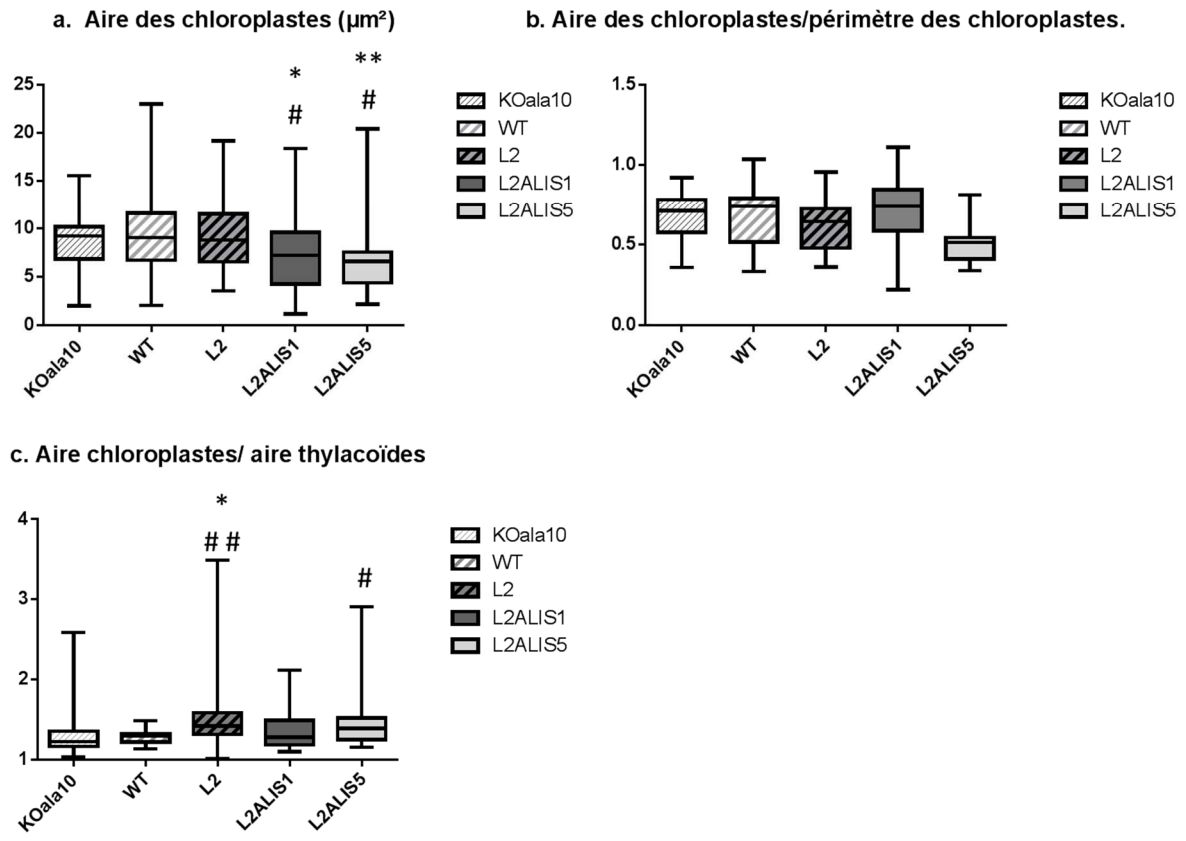


Figure 56 : Quantification des caractéristiques morphologiques des chloroplastes des lignées KOala10, L2, L2ALIS1 et L2ALIS5. *a. Analyse statistique de l'aire des chloroplastes des différentes lignées. b. Analyse statistique du ratio de l'aire des chloroplastes divisée par le périmètre des chloroplastes. c. Analyse statistique de l'aire des chloroplastes divisée par l'aire occupée par les thylacoides. Les mesures sont effectuées à l'aide du logiciel ImageJ. Analyse statistique: T-test de student, les astérisques représentent une différence statistiquement significative par rapport au WT, les dièses représentent une différence statistiquement significative par rapport au KOala10. Un symbole p<0;05, deux symboles p<0,01, n= 61, 34, 38, 42, 36 pour WT, KOala10, L2, L2ALIS1 et L2ALIS5 respectivement.*

Considérant qu'ALA10 est impliquée dans la synthèse des galactolipides et les échanges entre chloroplastes et RE, nous nous sommes ensuite intéressés aux contacts entre ces organites. Comme les chloroplastes présentent une certaine variabilité de taille entre les différentes lignées, cette variabilité pourrait être la source d'un biais dans l'analyse. Pour évaluer la probabilité d'observer un contact par longueur d'enveloppe, nous avons compté pour chaque chloroplaste dans les différentes lignées le nombre de contacts entre les endomembranes et chaque chloroplaste et nous avons divisé ce nombre par le périmètre observé de chaque chloroplaste (Figure 57). Ces observations révèlent que le KOala10 présente une diminution significative du nombre de contacts par rapport au WT alors que les lignées L2ALIS1 et L2ALIS5 présentent une augmentation significative du nombre de contacts. Il semblerait que la L2 présente une tendance similaire aux doubles surexpresseurs. Cependant, l'augmentation du nombre de contacts dans la lignée L2 n'apparait pas significative et un quart des chloroplastes au moins ne présentent aucun contact avec les endomembranes (Figure 57). La présence d'ALA10 dans le réticulum en absence d'ALIS est peut-être un facteur limitant pour le développement de ces contacts. Le fait que certains chloroplastes n'aient pas du tout de contact avec le RE dans une même cellule où d'autres chloroplastes ont des contacts avec le RE, suggère qu'il y a des localisations différentielles intracellulaires d'ALA10 et de ses différents complexes. Ces résultats indiquent aussi que la surexpression d'ALA10 en présence d'ALIS1 ou ALIS5 augmente le nombre de contacts entre le RE

et les chloroplastes. Il est à noter que l'augmentation est plus nette dans la L2ALIS5 que dans la L2 et la L2ALIS1.

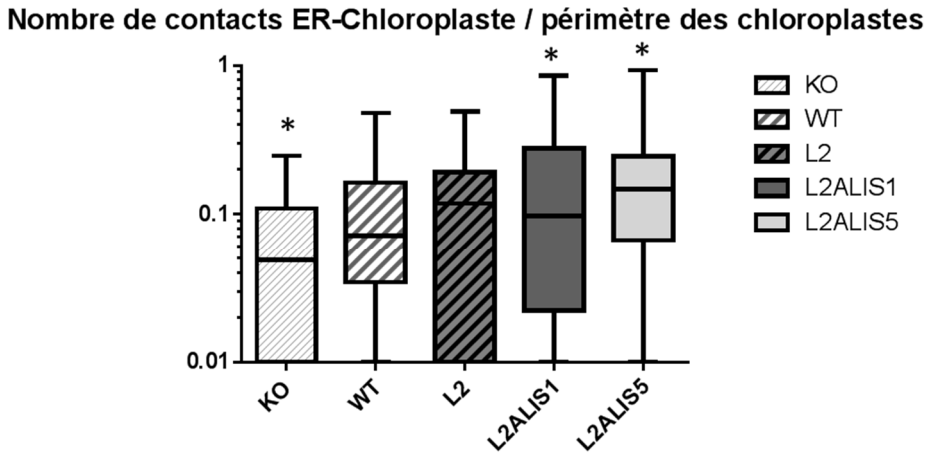


Figure 57 : Analyse statistique de contacts entre les endomembranes et les chloroplastes. *De façon à éviter un biais éventuel dû à la taille des chloroplastes observés, le nombre de contacts observés est divisé par le périmètre de chaque chloroplaste. Analyse statistique: T-test de student, les * représentent une différence statistiquement significative par rapport au WT à p<0,05, deux symboles p<0,01, n= 61, 34, 38, 42, 36 pour WT, KOala10, L2, L2ALIS1 et L2ALIS5 respectivement.*

Enfin, nous avons remarqué que dans le KOala10, les chloroplastes présentent des grains d'amidon plus nombreux et plus volumineux que dans toutes les autres lignées (Figure 58.a). Nous avons quantifié le nombre et la taille de ces grains d'amidon lorsqu'ils étaient présents au sein des chloroplastes dans les différentes lignées (Figure 58.b). Cette analyse révèle que dans le KOala10, les chloroplastes présentent significativement plus de grains d'amidon que dans les trois lignées de surexpresseurs, et que ces grains d'amidon sont significativement plus gros dans le KOala10 que dans les trois surexpresseurs. La lignée L2ALIS1 contient aussi significativement moins de grains d'amidon que la lignée sauvage, et ces grains d'amidon sont significativement plus petits dans la lignée L2ALIS5 que dans le sauvage. Afin d'affiner ces résultats, nous avons analysé le ratio de l'aire occupée par les grains d'amidon sur l'aire des chloroplastes dans lesquels ils sont présents (Figure 58.c). Nous avons pu déterminer que l'espace relatif occupé par les grains d 'amidon était significativement plus élevé dans le KOala10 que dans le WT, et qu'il était significativement diminué dans les surexpresseurs comparés au KOala10. En résumé, il semble qu'à 15 jours de culture en jours longs, le KOala10 contienne plus d'amidon que toutes les autres lignées et que les lignées dérivées de la L2 contiennent plutôt moins d'amidon que le sauvage et le KOala10 mais que les morphologies des grains d'amidon aboutissant à ces résultats diffèrent suivant l'ALIS surexprimé.

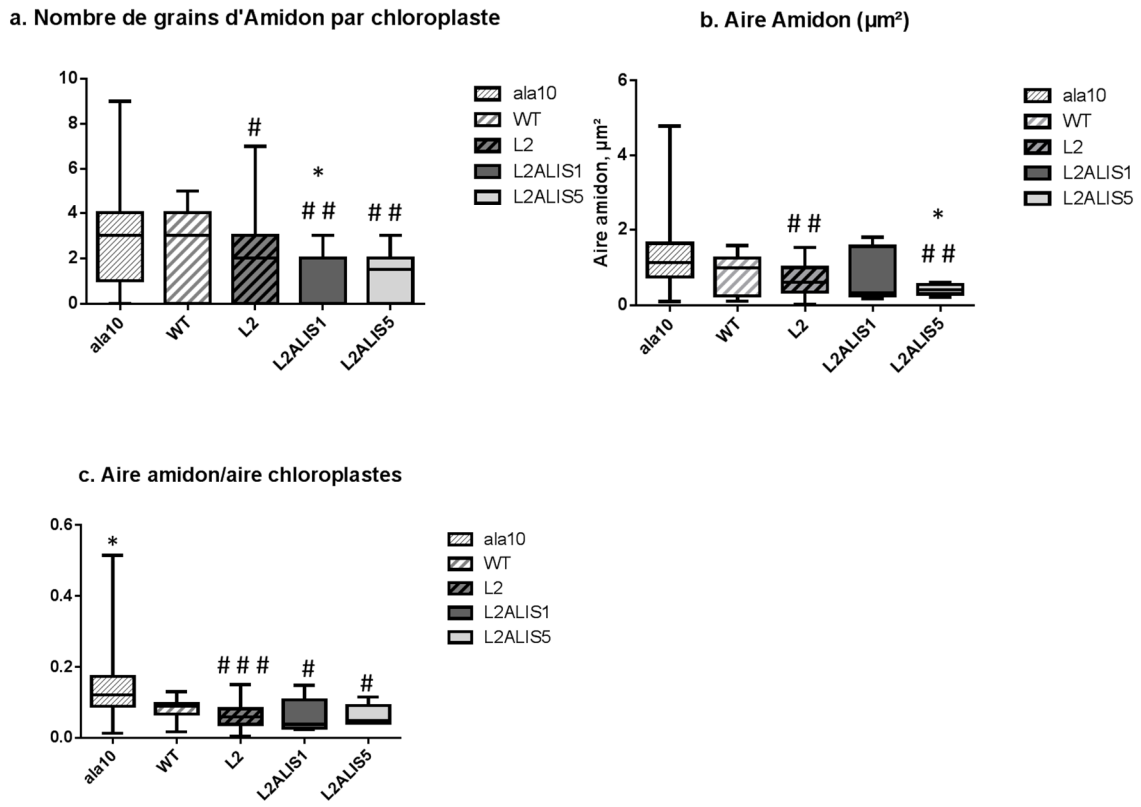


Figure 58 : Analyse statique concernant l'accumulation d'amidon dans les chloroplastes. *a. Analyse statistique du nombre de grains d'amidon par chloroplaste. b. Analyse de l'aire prise par les grains d'amidon dans chaque chloroplaste. c. Analyse statistique du ratio de l'aire occupée par les grains d'amidon divisée par l'aire des chloroplastes les contenant. Analyse statistique: T-test de student, les astérisques représentent une différence statistiquement significative par rapport au WT à p<0,05, deux symboles p<0,01, Pour a: n= 61, 34, 38, 42, 36 pour WT, KOala10, L2, L2ALIS1 et L2ALIS5 respectivement. Pour b et c: n= 11, 50, 19, 5 et 8 pour WT, KOala10, L2, L2ALIS1 et L2ALIS5 respectivement.*

Ces résultats nous ont conduits à analyser, dans des conditions d'accumulation de l'amidon (jours continus) à un stade de croissance plus tardif (4 semaines), dans quelle mesure les différentes lignées étudiées accumule l'amidon (Figure 59). Ces analyses ont été réalisées par coloration au Lugol/I2 sur le WT, les lignées KOala10, KOalis1 et KOalis5 ainsi que les différents surexpresseurs L2, L2ALIS1 et L2ALIS5. Les plantes KOalis1 et KOalis5 sont issues de lignées présentant une insertion de T-DNA dans la séquence codante (voir Partie Matériel et méthode IV.1.c). Les résultats sont préliminaires, mais il semble que 1) les lignées KOala10, KOalis1 accumulent plus l'amidon que les autres lignées, 2) les lignées L2ALIS1, L2ALIS5 et KOalis5 ont un phénotype similaire au WT, et 3) la L2 semble entièrement dépourvue d'amidon. Ces résultats semblent indiquer qu'ALA10 est impliquée dans les mécanismes de régulation du flux du carbone (aussi appelé carbone partioning) entre la production de lipide membranaires et la production d'amidon servant de réserve. Il se pourrait qu'ALA10 en favorisant la synthèse du MGDG et les transferts de lipides entre RE et chloroplaste favorise la production de lipides membranaires au dépend de l'amidon. Cette conclusion est cohérente avec le fait que dans les doubles surexpresseurs putatifs L2ALIS1, et L2ALIS5, nous avons observé une présence accrue d'endomembranes et plus particulièrement de RE alors que les endomembranes sont relativement peu développées dans le KOala10 et le WT (Figure 60). Un plus grand nombre d'observations ainsi qu'une quantification de l'accumulation d'amidon est cependant nécessaire pour confirmer ce résultat.

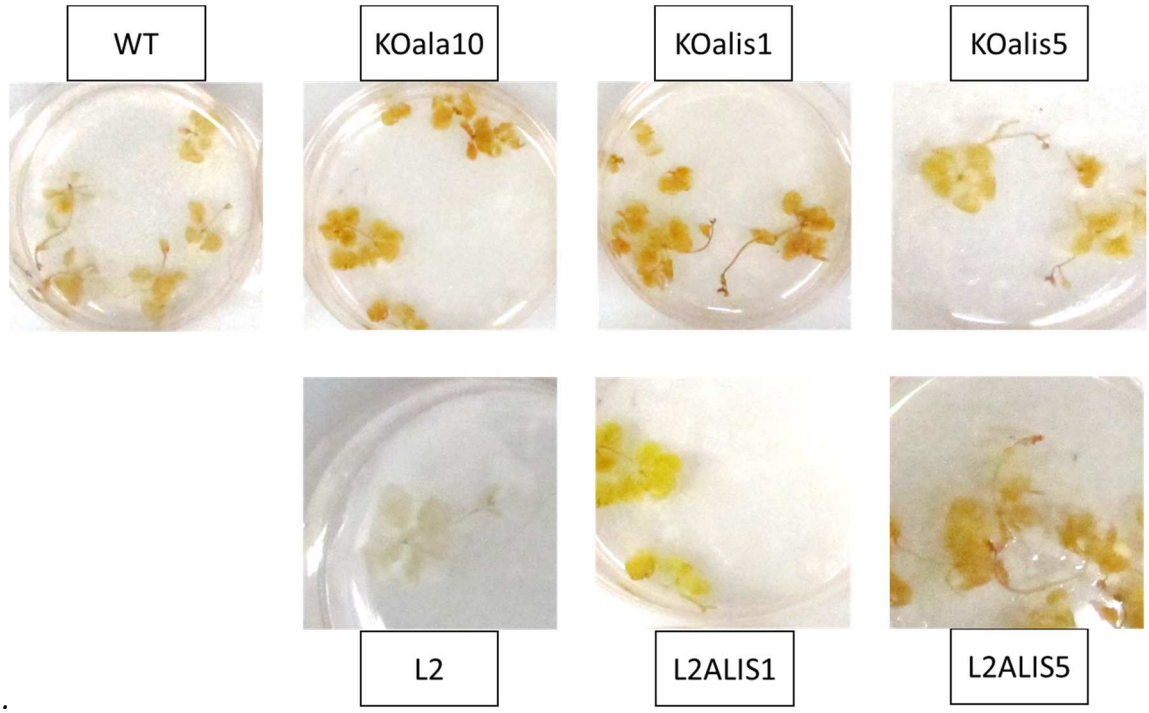


Figure 59 : Révélation de l'accumulation par infiltration des rosettes par une solution de Lugol/I_2 dans les lignées KOala10, KOalis1, KOalis5, L2, L2ALIS1, et L2ALIS5. *La présence d'amidon est révélée après décoloration des feuilles à l'éthanol, par une coloration brune des feuilles dues à la complexion de l'iode avec l'amidon. Afin d'induire l'accumulation d'amidon dans les plantes, celles-ci sont cultivées en jours continus pendant 4 semaines.*

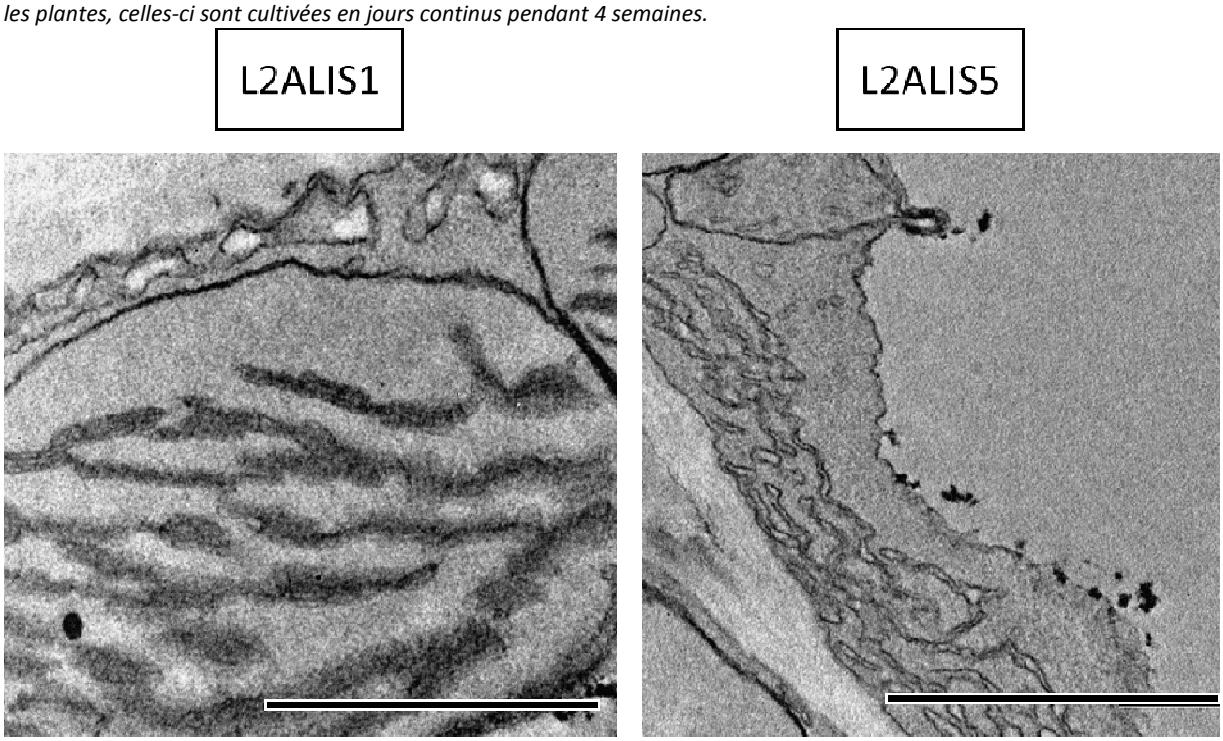


Figure 60 : Image obtenues lors de l'observation des lignées L2ALIS1 et L2ALIS5 montrant une forte quantité d'endomembranes. *Aucune image de ce type n'a été observée dans les autres lignées. La barre d'échelle représente 1µm.*

De manière générale, ces observations mettent en lumière que la surexpression d'ALA10 seule ou avec une ALIS impacte le développement des chloroplastes, ce qui se répercute sur leur taille et leur morphologie. Globalement, les variations observées dans les surexpresseurs vont dans le sens: diminution de la taille de chloroplastes et augmentation de la fréquence des contacts RE-chloroplastes.

Certains effets apparaissent spécifiques de l'ALIS qui est coexprimée avec ALA10 notamment la forme des chloroplastes comme le montre le ratio de l'aire sur le périmètre des chloroplastes. Pour connaitre la spécificité de l'impact d'ALA10 sur l'ultrastructure des chloroplastes, il faudrait quantifier les niveaux d'expression d'ALA10 et des ALIS dans les différentes lignées et répéter ces observations sur les lignées mutantes pour les ALIS. Enfin, il serait utile de savoir si ces effets sont dépendants de l'activité flippase d'ALA10 ou si c'est sa seule présence comme support d'un échafaudage moléculaire qui est importante.

3. Phénotype des plantes mutantes ala10, alis1, alis5

Afin de caractériser plus précisément le rôle d'ALIS1 et d'ALIS5 par rapport à celui d'ALA10, nous avons ensuite étudié le phénotype des plantes mutantes KO pour ALIS1 et ALIS5 en comparaison avec les lignées KOala10 et la L2.

Le fait qu'ALA10 puisse interagir avec l'une ou l'autre des deux ALIS nous a conduits à l'hypothèse suivante : ALA10 pourrait avoir plusieurs fonctions, possiblement exclusives, en fonction de l'ALIS avec laquelle elle interagit. Dans ce cas, l'élimination de l'une ou l'autre des ALIS conduirait à des phénotypes distincts. Par exemple, dans le KOalis1, seul le tandem ALA10-ALIS5 est présent et l'activité d'ALA10 en association avec ALIS5 pourrait être favorisée. Inversement, dans le KOalis5, seul le complexe ALA10-ALIS1 est présent, amplifiant l'importance de l'activité de celui-ci. Ainsi, dans cette analyse nous nous sommes attachés à rechercher des modifications phénotypiques entre les KOalis1 et KOalis5 corrélées avec des modifications phénotypiques du KOala10 et de la lignée L2 surexprimant ALA10 afin d'identifier le rôle des complexes ALA10-ALIS dans l'homéostasie lipidique.

a. Phénotype de croissance en fonction du cycle jour nuit

Suite aux résultats montrant que l'expression des gènes codant pour ALA10 et ALIS5 variait au cours du cycle jour/nuit, nous avons voulu déterminer dans quelle mesure des modifications de la photopériode avaient un impact sur le phénotype des plantes mutantes pour ALA10 ou pour les ALIS. Nous avons donc cultivé en parallèle les plantes issues de différentes lignées sur milieu MS, soit en condition de jours longs (16h d'éclairement pour 8h d'obscurité), soit en jours courts (8h d'éclairement pour 16h d'obscurité). Au terme de 15 j de culture, dans les conditions de jours courts, les plantes KOalis1 sont significativement plus développées et les plantes KOala10 et KOalis5 sont les moins développées (Figure 61 a et b). Ces différences apparaissent aussi dans les mesures de poids frais des parties aériennes (ou rosettes) de ces plantes (Figure 61.c et d). En conditions de jours longs, les plantes sont plus développées qu'en jours courts, le KOalis1 parait avoir une taille légèrement supérieure aux autres mais les différences observées ne sont pas significatives (Figure 61). Il semble que le KOala10 présente une tendance similaire au KOalis5 en jours courts bien qu'il n'y ait pas de différences significatives. Ces premiers résultats pourraient indiquer que le complexe ALA10-ALIS5 joue un rôle critique dans le développement de la partie foliaire des plantes en jours courts, lorsque la lumière est un facteur limitant pour le développement.

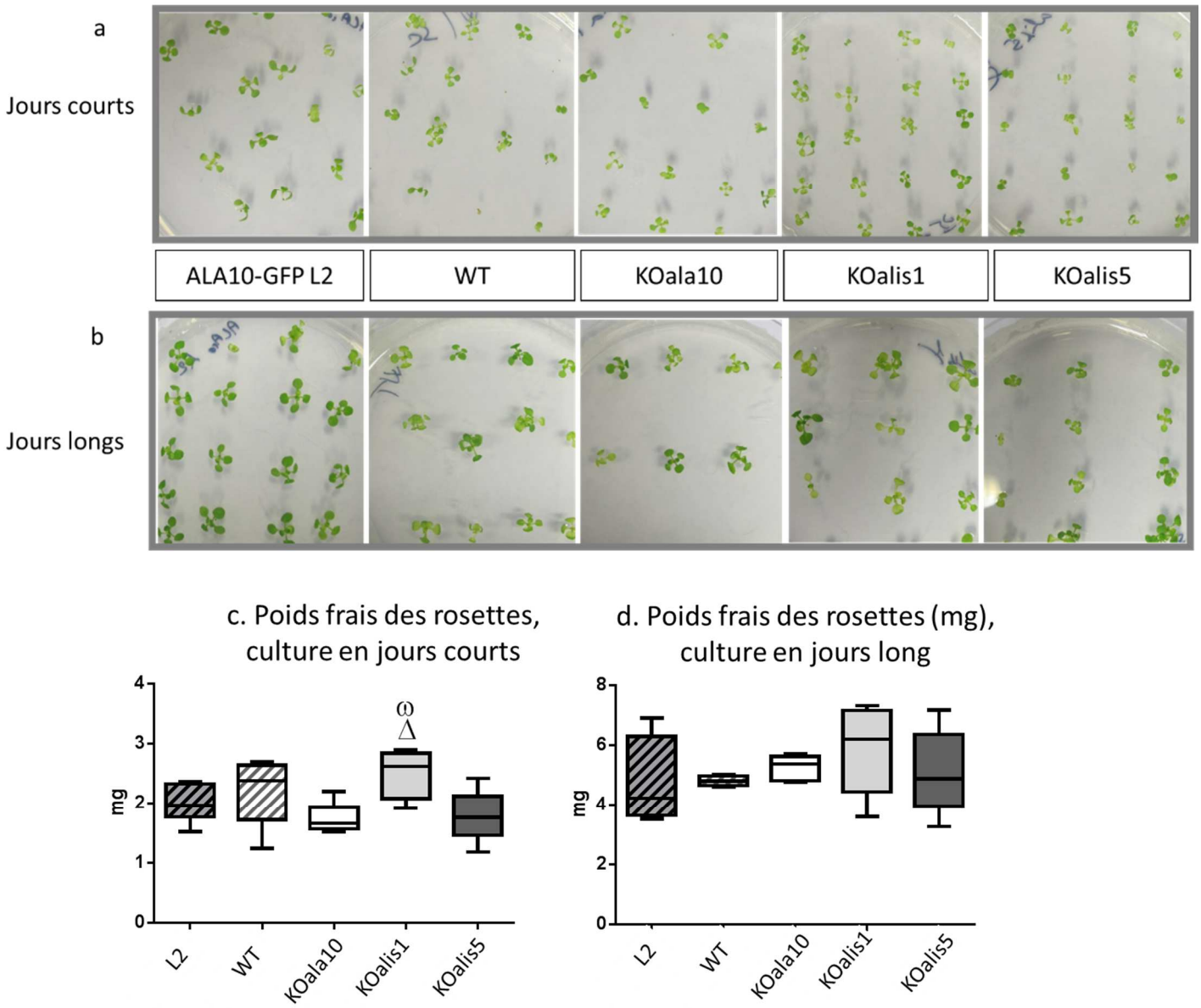


Figure 61 : Phénotype de croissance (a et b) et mesure de poids frais (c et d) des plantes L2, WT, KOala10, KOalis1 et KOalis5 au terme de 15 jours de croissance en jours courts (8h de jours/ 16h de nuit) (a et c), ou en jours longs (16h de jour/ 8h de nuit) (b et d). *Plantes cultivées à 20°C, sur milieu MS+ 0,5% sucrose, 1mM MES pH5.7, 0,8% agarose Test statistique : T-test non apparié. Les différences statistiquement significatives sont à p<0.05, Δ par rapport au KOala10, ω par rapport au KOalis5. En jours courts N= 30 pour L2 et WT, N=25 pour KOala10, KOalis1 et KOalis5. En jours long N=20 pour KOala10, KOalis1 et KOalis5, N=16 pour L2 et WT. Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

b. Phénotype lipidique des lignées mutantes pour ALA10, ALIS1 et ALIS5

1. Teneur et composition en acides gras

Afin de déterminer lequel des deux complexes ALA10-ALIS est le plus impliqué dans le phénotype lipidique observé dans les mutants ALA10 (voir Résultats chapitre I), nous avons analysé les lipides des lignées mutantes KOala10, KOalis1, KOalis5 et dans la lignée surexpresseur L2. Pour ce faire, les lipides ont été extraits des rosettes de ces différentes lignées au terme de 15 jours de culture en jours courts et jours longs. Dans un premier temps, cette analyse s'est concentrée sur la quantité et la composition des acides gras totaux.

Dans les deux conditions de culture, il apparait que la quantité d'acides gras totaux par rosette dans le KOalis5 est plus faible que dans toutes les autres lignées et que cette différence est significative en

jours courts, alors qu'en jours longs la forte variabilité ne permet pas de conclure (Figure 62). Par ailleurs, en jours courts, les plantes L2 et KOalis1 semblent contenir légèrement plus d'acides gras que les plantes WT et KOala10, ce qui pourrait indiquer que, dans ces conditions, le complexe ALA10-ALIS5 influe positivement sur la production d'acide gras comme sur la croissance des plants. En jours longs, cependant, le KOala10 présente une quantité d'acide gras similaire à la L2 et au KOalis1, ne permettant aucune conclusion.

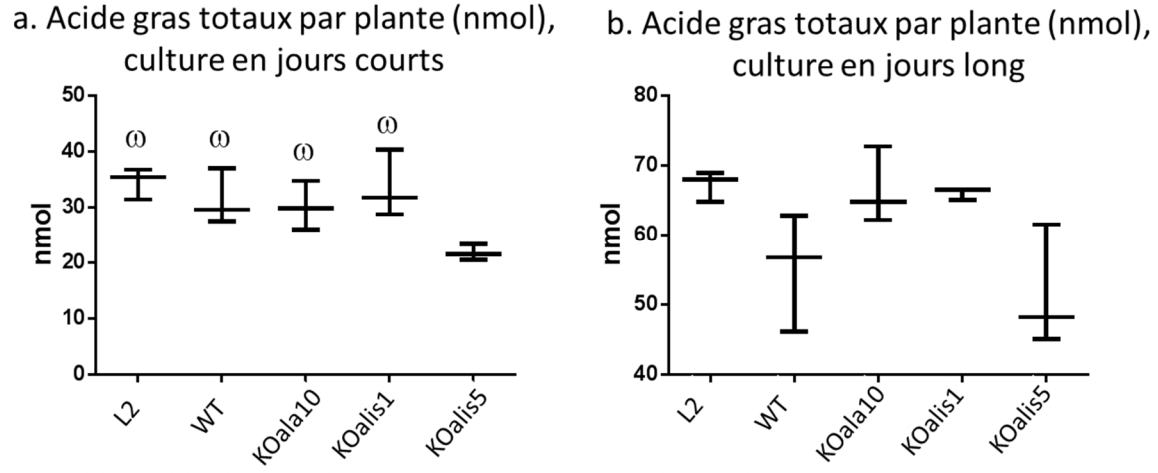


Figure 62 : Mesure des quantités d'acides gras totaux par rosette dans les lignée les lignées L2, KOala10, KOalis1 et KOalis5 cultivées en jours courts (a) ou en jours longs (b). *Les histogrammes représentent la moyenne de trois mesures indépendantes, la barre d'erreur représente la déviation standard. En jours courts chaque extraction regroupe 5 plantes, en jours long chaque extraction regroupe 4 plantes. Test statistique: ANOVA, ω: différences statistiquement significatives à p<0.05 par rapport au KOalis5. Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

Concernant le profil d'acides gras dans ces lignées, l'analyse en GC-FID nous a permis de mettre en évidence des modulations dans les quantités et les proportions des différents acides gras entre les lignées (Figure 63). Concernant les quantités d'acides gras, on observe que la lignée KOalis5 présente en jours longs une plus faible quantité d'acides gras 18:3 que les autres lignées mutantes. En jours courts, le KOalis5 présente moins de 18:2 que le WT, KOala10, et KOalis1, et moins de 18:3 que toutes les autres lignées. On observe aussi que les lignées L2 et KOalis1 présentent une augmentation de la quantité des acides gras 18:3 par rapport au WT et au KOala10 particulièrement en jours courts. Il semble qu'en jours courts le complexe ALA10-ALIS5 soit donc important pour la production des acides gras à 18 atomes de carbone et pour la désaturation finale en 18:3 de ces acides gras. Ainsi il semble que le complexe ALA10-ALIS5 soit important pour la production des acides gras à 18:2 et 18:3 qui sont les formes majoritaires des acides gras à 18 carbones.

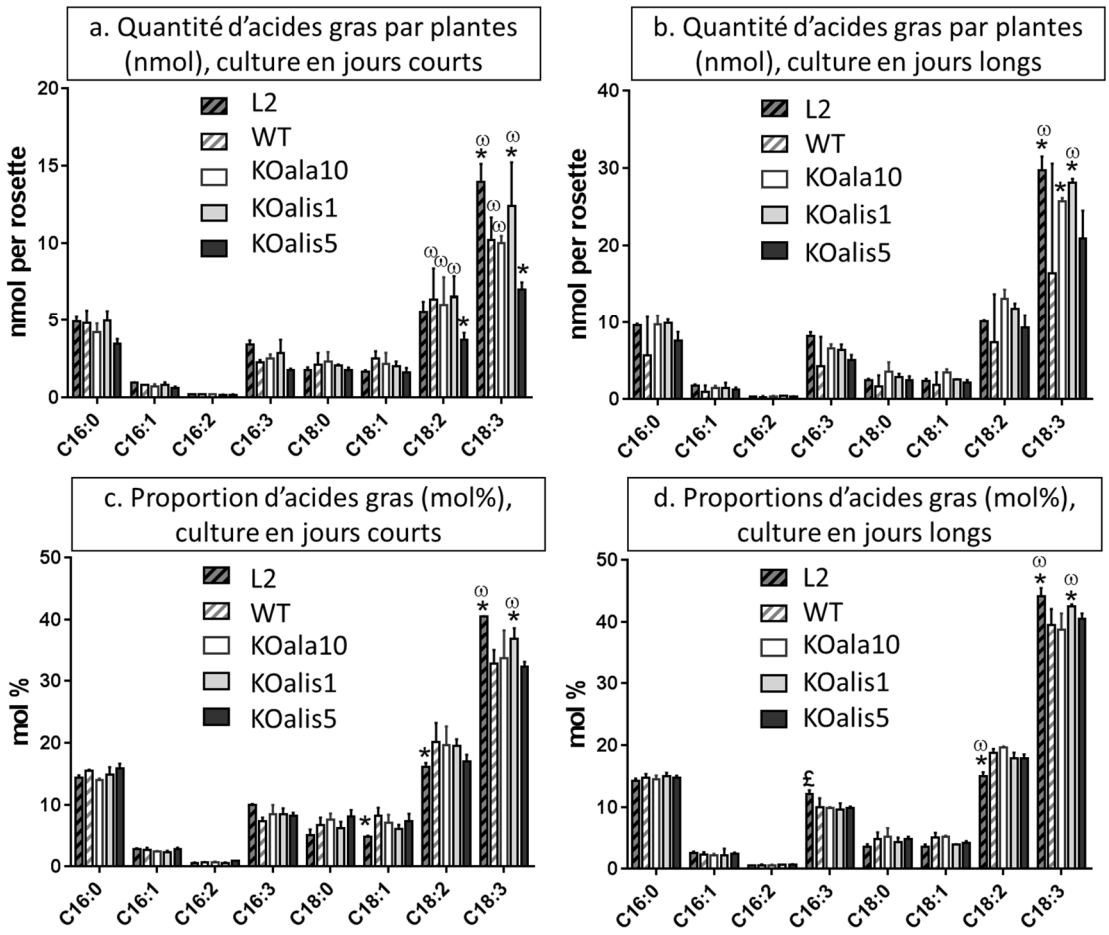


Figure 63 : Profil des acides gras totaux dans les lignées L2, KOala10, KOalis1 et KOalis5 cultivées en jours courts (a et c) et en jours longs (b et d). *Analyse effectué en GC-FID. Les histogrammes représentent la moyenne de trois mesures indépendantes, les barres d'erreurs représentent la déviation standard. En jours courts, chaque extraction regroupe 5 plantes, en jours longs chaque extraction regroupe 4 plantes. Analyse statistique: test ANOVA, différences statistiquement significatives à p<0.05 * par rapport au WT, ω par rapport au KOalis5. Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

Les proportions des différents acides gras présentent de plus faibles variations que les quantités mais permettent de mettre en évidence des modulations du processus de désaturation dans les différentes lignées. En effet, en jours long la L2 présente des proportions de 18:2 plus faible que le WT et le KOalis5, mais une augmentation de la proportion de 18:3 par rapport à ces mêmes lignées. On peut noter, que de la même façon, le KOalis1 présente une augmentation de la proportion de 18:3 par rapport au WT et au KOalis5.

Or, récemment, (Mei et al., 2015), ont montré dans des cellules d'*Arabidopsis* en culture que la croissance et donc la synthèse des membranes est négativement corrélée avec la désaturation des lipides. On pourrait donc s'attendre à ce que le KOalis5, qui a une croissance plus faible et qui synthétise moins de lipides, ait un taux d'acides gras 18:3 plus important que les autres lignées notamment la L2 et le KOalis1 qui se développent plus rapidement. Le fait qu'on observe le phénotype inverse: une augmentation de la proportion de 18:3 dans la L2 et dans le KOalis1 et une diminution dans le KOalis5, indique que dans nos conditions de culture, la croissance n'est pas un facteur limitant pour la désaturation des lipides et donc que le complexe ALA10-ALIS5 a un impact positif sur la production mais aussi s la désaturation des acides gras à 18 atomes de carbone.

2. Composition lipidique globale

Les lipides issus des plantes ont ensuite été séparés par chromatographie liquide et analysés par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) afin de déterminer les modifications de chaque classe lipidique individuellement. L'ensemble des analyses ci-dessous ont été réalisées en triplicat biologique sur une même expérience. Elles sont préliminaires et nécessitent d'être reproduites, notamment en ce qui concerne la quantification globale des classes de lipides. Dans un premier temps, l'abondance des principaux lipides des membranes chloroplastiques et des endomembranes (MGDG, DGDG, PC et PE) a été analysée (Figure 64). En jours courts, les quantités de MGDG dans la L2 et dans le KOala10 sont plus importantes que dans le sauvage et la lignée KOalis5. De plus la quantité de PC dans le KOalis5 est significativement diminuée par rapport à toutes les autres lignées. Pour les plantes cultivées en jours longs, les quantités de MGDG et DGDG dans la L2 sont significativement plus importantes que dans les lignées, sauvage, KOalis1 et KOalis5. La quantité de PC dans la L2 est significativement plus importante que dans la lignée WT et dans le KOalis5. Dans les deux conditions de culture, les classes de lipides les plus affectées sont le MGDG et la PC, comme ce qui avait été vu précédemment. Pour ce qui concerne la PC, l'augmentation dans la L2 et la diminution dans le KOalis5 d'une part, et les variations minimes entre le WT, KOala10 et KOalis1 d'autre part, corrobore l'hypothèse du rôle du complexe ALA10-ALIS5 dans l'homéostasie de ce lipide.

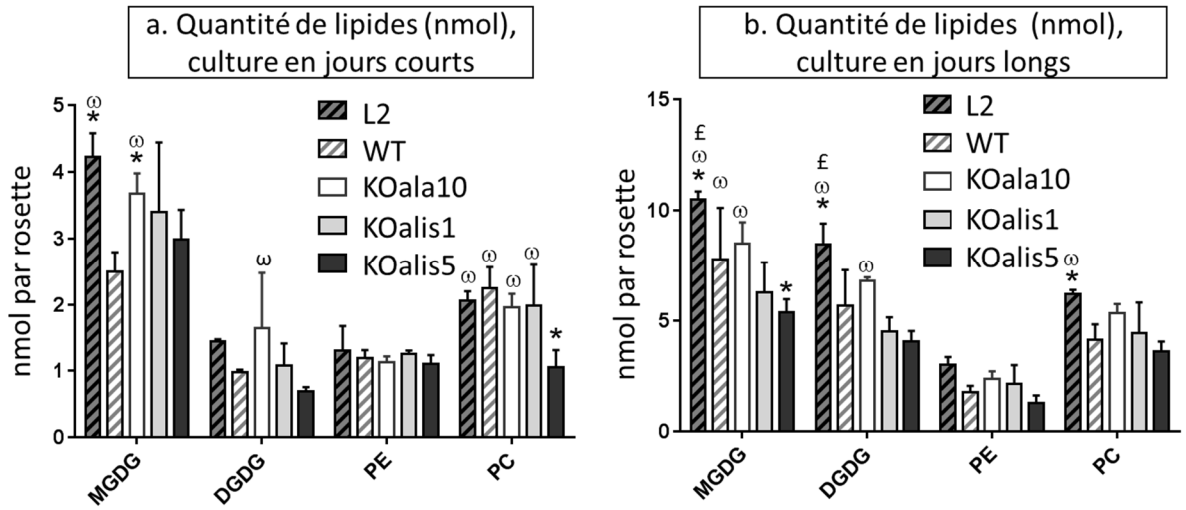


Figure 64 : Analyse des quantités de MGDG, DGDG, PC et PE dans les lignées L2, WT, KOala10, KOalis1 et KOalis5 cultivées en jours courts (a) et jours long (b)*. Représentation des moyennes de 3 mesures indépendantes regroupant pour chacune 5 plantes (jours courts) ou 4 plantes (jours longs). Analyse statistique: test ANOVA, différences statistiquement significatives à p<0.05 * par rapport au WT, ω par rapport au KOalis5, £ par rapport au KOalis1. Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

c. Analyse du profil d'acide gras du MGDG, de la PC et de la PE.

1. Profil d'acide gras du MGDG

Comme nous l'avons vu, il semblerait que le complexe ALA10-ALIS5 module la synthèse de PC et que ALA10 module la synthèse de MGDG. Comme la PC est à l'origine d'une partie de la synthèse des galactolipides par la voie dite eucaryote, nous avons voulu déterminer si ALA10-ALIS5 influe sur l'équilibre entre lipides eucaryotes et procaryotes. Pour cela, nous avons mesuré le ratio MGDG eucaryote/MGDG procaryote. Ce ratio a été évalué en faisant le rapport entre les formes eucaryotes 36:n de MGDG et les formes procaryotes 34:n (Figure 65). On observe une diminution de ce ratio dans le sauvage et dans les différentes lignées KO quand on passe des jours courts aux jours longs. La modulation de ce ratio en fonction de la photopériode peut s'expliquer par le fait que les gènes

impliqués dans la voie procaryote sont fortement réprimés pendant la nuit, alors que l'apport de DAG issue de la PC continue (Shen et al., 2010; Szymanski et al., 2014). De façon surprenante, le ratio de la L2 reste constant quelle que soit la photopériode et reste à un niveau intermédiaire de celui des lignées WT et KO en jours courts et jours longs.

Bien que ce résultat ne permette pas de trancher quant à l'implication de l'une ou l'autre des deux ALIS vis-à-vis du rôle d'ALA10, il montre que la disruption de la régulation transcriptionnelle d'ALA10 dans la L2 (sous le contrôle du promoteur 35S et donc exprimée en continu) influe sur le ratio MGDG eucaryote/MGDG procaryote en le stabilisant entre les différentes photopériodes. Ce résultat confirme le rôle régulateur d'ALA10 dans la synthèse des galactolipides. Cependant le fait que cet effet soit indépendant d'ALIS1 et d'ALIS5 suggère qu'ALA10 pourrait fonctionner seule ou interagir avec une autre ALIS ou encore que ce rôle pourrait être dû à une fonction non catalytique d'ALA10 comme celui d'échafaudage moléculaire.

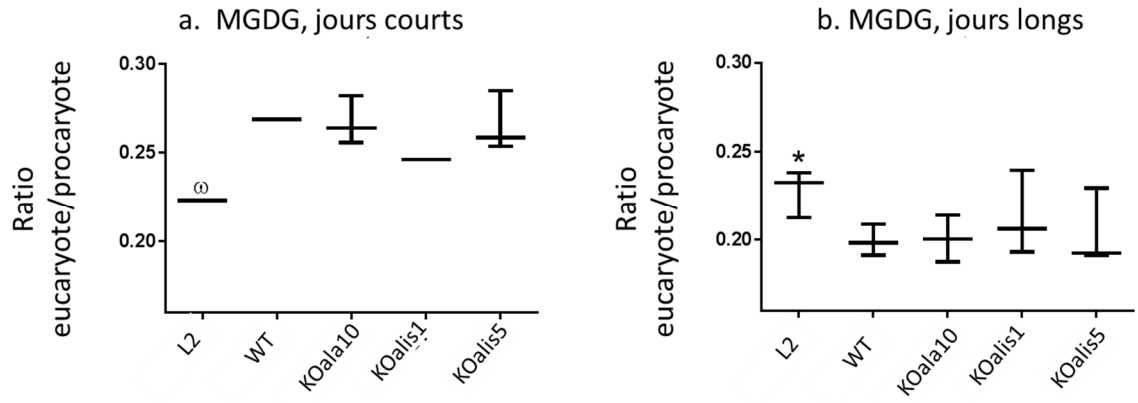


Figure 65 : Analyse du ratio de MGDG procaryote/MGDG d'origine eucaryote*. Le MGDG d'origine procaryote est défini comme la somme des formes de MGDG 34:6+34:5+34:4, le MGDG eucaryote est défini comme la somme des formes de MGDG 36:6+36:5+36:4. Représentation des médianes et des valeurs extrêmes de trois mesures indépendantes en jours longs, en jours courts représentation de 2, 1, 3, 1 et 3 mesures pour L2, WT, KOala10, KOalis1 et KOalis5 respectivement. En jours courts, chaque extraction regroupe 5 plantes, en jours longs chaque extraction regroupe 4 plantes. Analyse statistique: test ANOVA, différences statistiquement significatives à p<0.05 * par rapport au WT, ω par rapport au KOalis5. Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

2. Profil d'acide gras de la PC

Du fait de l'importance d'ALA10 dans la désaturation de la PC montrée dans (Résultats, chapitre I), nous nous sommes intéressés au profil de désaturation de la PC dans les différentes lignées. Dans ce paragraphe, nous considèrerons d'une part la désaturation de la PC 34:n qui comporte majoritairement du 16:0 en position sn-1 et un acide gras à 18 atomes de carbone en position sn-2, et d'autre part la désaturation de la PC 36:n qui comporte 2 acides gras à 18 atomes de carbone. Il est à noter que ces résultats sont encore préliminaires et nécessitent d'être confirmés.

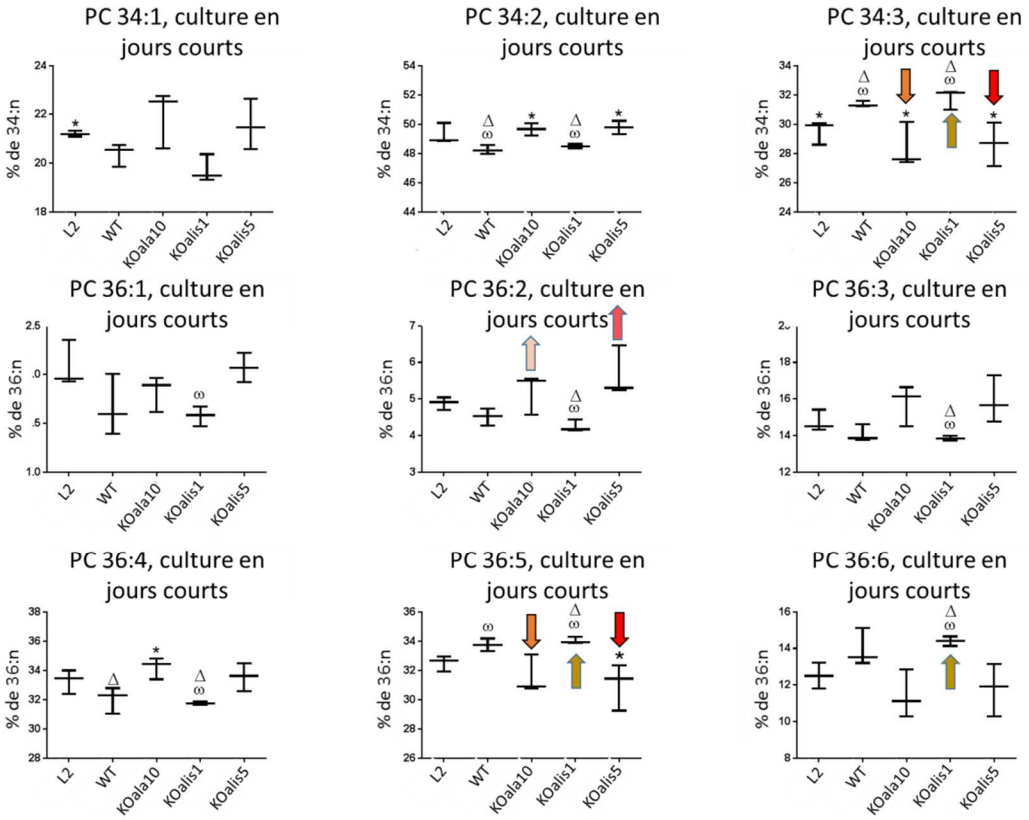


Figure 66 : Analyse de la désaturation des acides gras de la PC dans les plantes L2, KOala10, KOalis1 et KOalis5 cultivées en jours courts. *Les histogrammes représentent la médiane de trois mesures indépendantes, les barres d'erreur représentent les valeurs extrêmes. Chaque forme de désaturation est représentée proportionnellement en pourcentage des molécules de PC ayant le même nombre de carbone total. Analyse statistique: test ANOVA, différences statistiquement significatives à p<0.05 * par rapport au WT, ω par rapport au KOalis5, Δ par rapport au KOala10. Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

En jours courts (Figure 66), on voit que des variations significatives apparaissent entre les différentes lignées pour toutes les formes de PC. De manière générale, la majorité des formes intermédiaires de désaturations 34:1, 34:2, 36:1, 36:2, 36:3 et 36:4, sont plus abondantes dans le KOala10 et dans le KOalis5 que dans le WT et dans le KOalis1. Alors que les formes de PC pouvant porter un acides gras 18:3 telles que les formes 34:3, 36:5 et 36:6 sont moins abondantes dans le KOala10 et le KOalis5 que dans le WT et le KOalis1. On remarque que, de façon systématique, les différences entre le KOalis1 et le KOalis5 sont statistiquement significatives et que, pour la plupart des mesures, la L2 présente une tendance similaire au KOala10. Le fait que la surexpression d'ALA10 et son absence induise de manière similaire une réduction de la désaturation de la PC avait été remarqué lors de l'étude précédente (voir Résultats chapitre I). Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'ALA10, surexprimée fortement dans la lignée L2, dépasse son optimum d'efficacité sur la désaturation par FAD2. La diminution relative des formes 36:5 et 36:6 dans le KOala10 et le KOalis5 par rapport au WT et au KOalis1 indique que le complexe ALA10-ALIS5 favorise la désaturation des acides gras a 18 atomes de carbone par rapport au complexe ALA10-ALIS1.

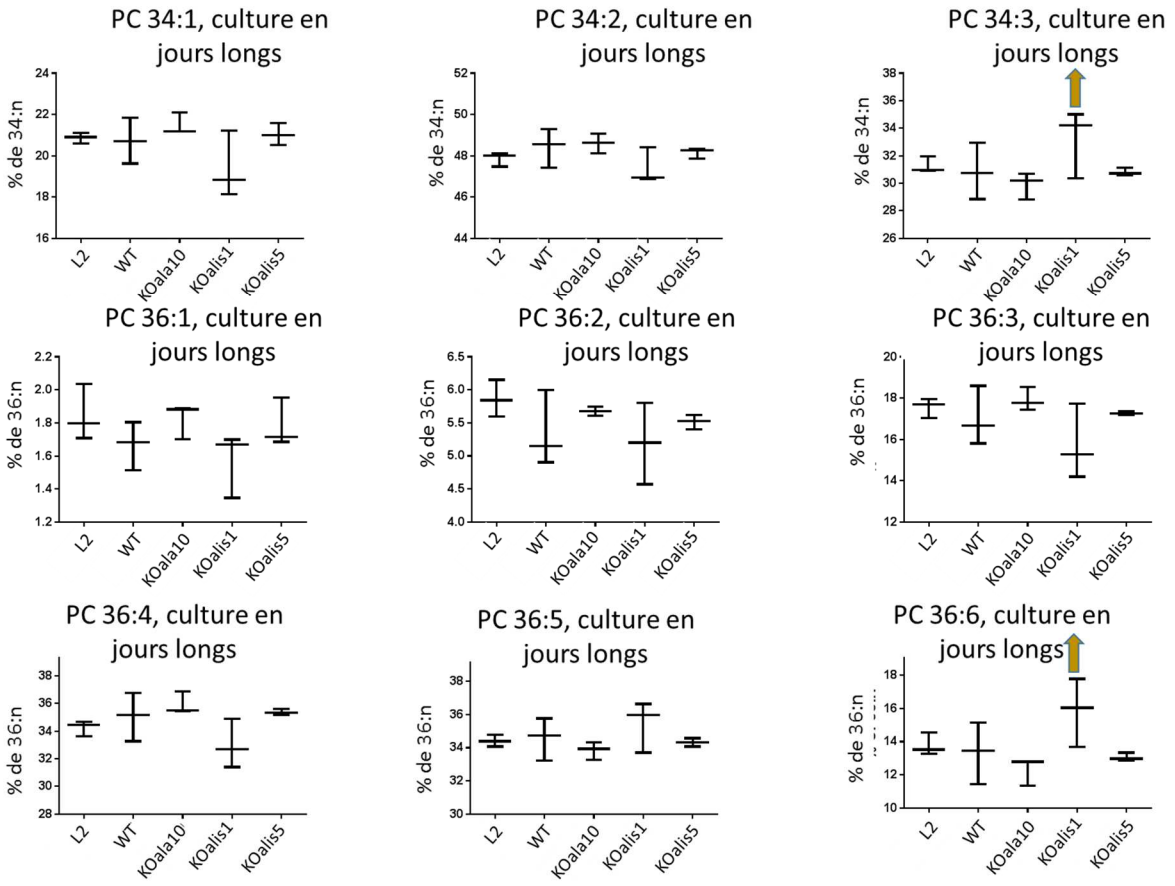


Figure 67 : Analyse de la désaturation des acides gras de la PC dans les plantes L2, KOala10, KOalis1 et KOalis5 cultivées en jours longs. *Les histogrammes représentent la médiane de trois mesures indépendantes, les barres d'erreur représentent les valeurs extrêmes. Chaque forme de désaturation est représentée proportionnellement en pourcentage des molécules de PC ayant le même nombre de carbone total. Analyse statistique: test ANOVA, différences statistiquement significatives à p<0.05, * par rapport au WT, ω par rapport au KOalis5, Δ par rapport au KOala10. Seules les partie aériennes des plantes ont été récoltées et analysées.*

En jours longs (Figure 67), on observe également des modulations des proportions des différentes formes de PC qui ont la même tendance que celles observées en jours courts, mais ces différences sont fortement atténuées et non significatives. Cela peut s'expliquer par le fait qu'ALA10 étant exprimée préférentiellement la nuit, les effets dépendants d'ALA10 sont moins marqués lorsque la période d'obscurité est plus courte.

d. Discussion sur le phénotype lipidique

Cette analyse, bien que partielle et nécessitant d'être reproduite et étendue, révèle qu'en fonction de l'ALIS qui interagit avec elle, ALA10 serait impliquée dans différents aspects du métabolisme de lipides. En effet, dans les feuilles, le phénotype du surexpresseur d'ALA10 (L2) est similaire au KOalis1 et inversement, le phénotype du KOala10 est plus proche de celui du KOalis5, suggérant que, dans les tissus verts, ALA10 est majoritairement en association avec ALIS5. Le complexe ALA10-ALIS5, dans le KOalis1 ou dans la L2, pourrait favoriser la production et l'export d'acides gras à 18 atomes de carbone du chloroplaste, permettant la production de PC et de MGDG et un développement foliaire plus rapide. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le KOalis5 présente une quantité d'acides gras 18:2 et 18:3 ainsi qu'une quantité de PC très fortement diminuées. On notera que ces deux phénotypes sont certainement liés puisque les acides gras au niveau du réticulum sont principalement incorporés et désaturés sur la PC. En revanche, l'effet d'ALA10 favorisant la désaturation intermédiaire de la PC observé dans les cultures cellulaires non chlorophylliennes (Résultats, chapitre I), comme dans le

KOalis5, est vraisemblablement le fait du complexe ALA10-ALIS1. Ce complexe parait être défavorable à la formation des formes finales de désaturation en 18:3 de la PC. Cette hypothèse est soutenue par le fait que dans les tissus chlorophylliens, ALA10 est plutôt localisée à proximité des chloroplastes, donc en association avec ALIS5, alors que dans l'épiderme ou les racines, ALA10 est localisée à proximité de la membrane plasmique, donc probablement en association avec ALIS1.

D'autre part, la photopériode module nettement les effets de la disruption d'ALA10, ALIS1 et d'ALIS5: les phénotypes des mutants associés sont moins marqués en jours longs qu'en jours courts. Cela peut être dû au fait qu'ALA10 est exprimée la nuit comme l'a révélé l'analyse transcriptomique. Ainsi une modification de la longueur de la période d'obscurité pourrait modifier le temps pendant lequel ALA10 est exprimé ou sensé être exprimé dans le cas du KOala10. Nous avons aussi vu qu'indépendamment d'ALIS1 et d'ALIS5, la surexpression constitutive d'ALA10 a un impact positif sur la synthèse de MGDG et semble limiter les effets de la photopériode sur le ratio de MGDG eucaryote/MGDG procaryote.

Afin de confirmer ces résultats, il est nécessaire de quantifier le niveau d'expression des ALIS dans les différentes lignées L2, WT, KOalis1 et KOalis5, il faudrait aussi répéter l'analyse lipidomique sur des cultures indépendantes, et l'étendre à des lignées surexprimant ALA10 à un niveau plus faible comme la L1 et surexprimant de concert ALA10 avec chacune des ALIS (les dernière lignées ont été obtenues en fin de thèse). Il serait également bon de vérifier les efficacités relatives de FAD2 et FAD3 dans ces lignées ce qui ne peut être fait que par une analyse classique (chromatographie sur couche mince des lipides, méthanolyse, analyse par chromatographie en phase gazeuse de leur composition en acides gras). Enfin, du fait que les expressions d'ALIS1 et d'ALIS5 sont partiellement redondantes, la détermination de l'affinité d'ALA10 vis à vis de l'une ou l'autre serait un plus. Cette mesure pourrait être faite en utilisant la technique de BiFC compétitif qui tire parti du fait que la CFP et la YFP partagent un même domaine Cter mais ont différentes longueurs d'ondes d'émission (Hynes et al 2009).

4. ALA10, les ALIS, et les variations journalières de la PC.

Nous avons vu dans le chapitre I qu'ALA10 peut interagir avec FAD2 et est impliquée dans l'équilibre entre les désaturations de la PC par FAD2 et FAD3. Nous voyons maintenant qu'en interaction avec ALA10, les protéines ALIS5 et d'ALIS1 peuvent moduler de manière opposée la production des lipides eucaryotes et le niveau de désaturation finale de la PC, ALIS5 favorisant la production de 18:3 et ALIS1 la réprimant. Cet effet est dépendant de la photopériode, peut-être parce qu'ALIS5 ainsi qu'ALA10 sont exprimées principalement en début de phase obscure et ont donc plus le temps d'agir en jours courts avec des nuits plus longues. Or, récemment, il a été montré que les proportions des différentes formes de PC sont soumises à des variations au cours du cycle journalier (Nakamura et al., 2014b) (Figure 68). Ces variations sont moins marquées en nuits courtes (jours longs) qu'en nuits longues (jours courts), ce qui est cohérent avec nos observations. Lors de la phase lumineuse, il apparait que les proportions des formes peu désaturées de la PC augmentent et que, pendant la nuit, les formes très désaturées de la PC, 36:5 et 36:6, augmentent jusqu'à atteindre un maximum au moment de la transition nuit/jour. Ces variations des différentes formes de désaturations sont spécifiques de la PC et ne sont pas retrouvées sur la PE (Figure 68). Ces variations pourraient être dues au fait que les acides gras sont produits très majoritairement lors de la phase lumineuse (Browse et al., 1981; Nakamura et al., 2014a; Ohlrogge and Jaworski, 1997). L'apport de 18:1 qui nourrit en premier lieu la synthèse de PC ferait diminuer la proportion d'acides gras fortement désaturés et engorgerait la désaturation par FAD2 et FAD3 qui serait limitante pendant la phase lumineuse. Lors de la phase obscure, la synthèse des acides

gras est ralentie, FAD2 et FAD3 ne seraient plus saturées et le complexe ALA10-ALIS5 permettrait le contrôle fin du taux de désaturation de la PC.

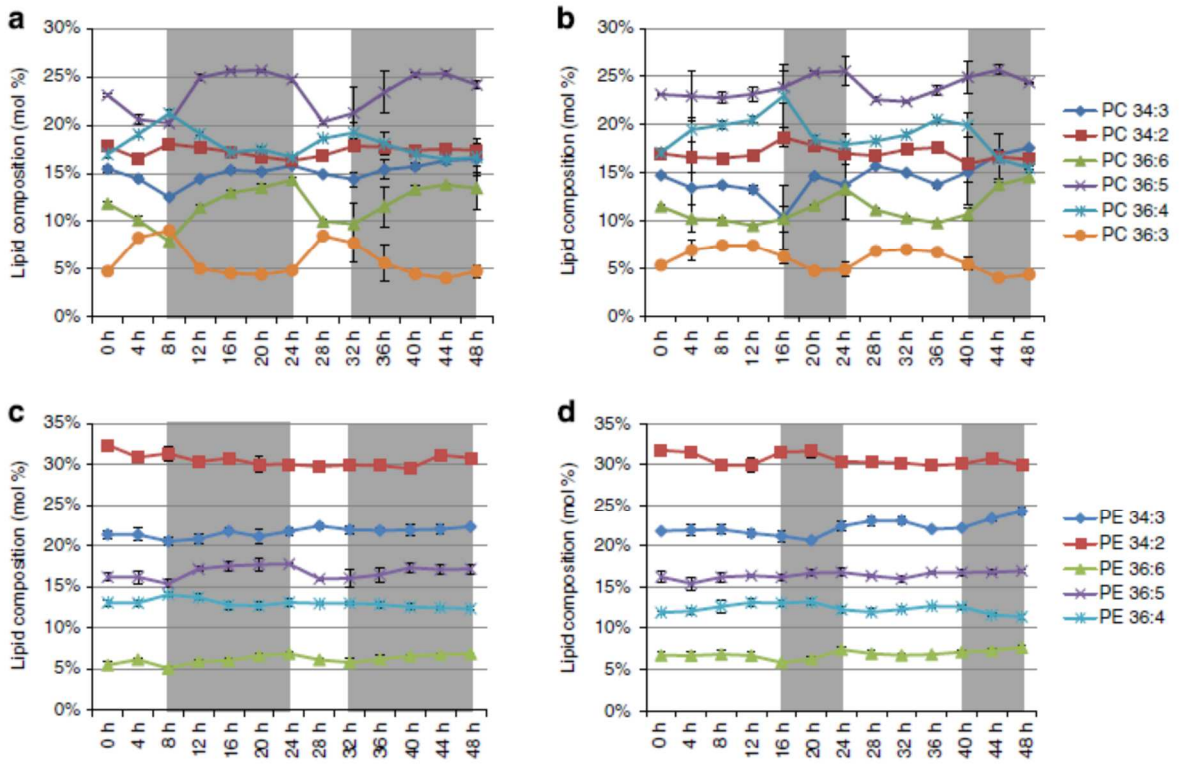


Figure 68 : Analyse des variations journalières des différentes formes de PC et de PE en fonction de la photopériode (Issu de Nakamura et al., 2013). *Les analyses ont été effectuées par spectrométrie de masse (MS-MS) sur des plantules de deux semaines cultivées en jours longs. Le début de la cinétique est effectuée 24h après transfert dans les conditions de photopériode indiquées: en jours courts (a et c) et jours longs (b et d). Les données indiquent la moyenne et la déviation standard de 4 réplicats indépendants. Les zones grises représentent la phase d'obscurité.*

a. Impact d'ALA10 et des ALIS sur la floraison

La caractérisation d'un mutant portant une mutation dans le promoteur du gène FAD3, surexprimant cette désaturase, a révélé qu'il présente un retard de déclenchement de la floraison par rapport aux plantes sauvages (Arondel et al., 1992). (Nakamura et al., 2014b) propose que la protéine FT, aussi appelée florigène car principal déclencheur de la floraison, se lie à la PC peu désaturée mais pas à la PC 36:6 (Figure 69). La protéine FT est produite dans les cellules compagnons du phloème. Si le RE est riche en PC 18:3, FT ne peut pas se lier au RE et est soluble dans le cytosol ce qui empêche sa migration vers le méristème apical. En jours longs, la PC du RE est moins désaturée, FT est retenue dans le RE (Nakamura et al., 2014b), ce qui favoriserait sa migration vers le méristème apical. Une fois dans le méristème apical, FT se lie à la protéine FD et active l'expression d'APETALA et de SUPPRESOR OF CONSTANCE, ce qui déclenche la transition florale. Le lien entre désaturation de la PC et déclenchement de la floraison a été mis en évidence par la caractérisation du mutant fad3+ (Nakamura et al., 2014b), surexpresseur du gène FAD3. Ce mutant présente une augmentation de la proportion de PC 18:3 et a une floraison retardée par rapport au WT.

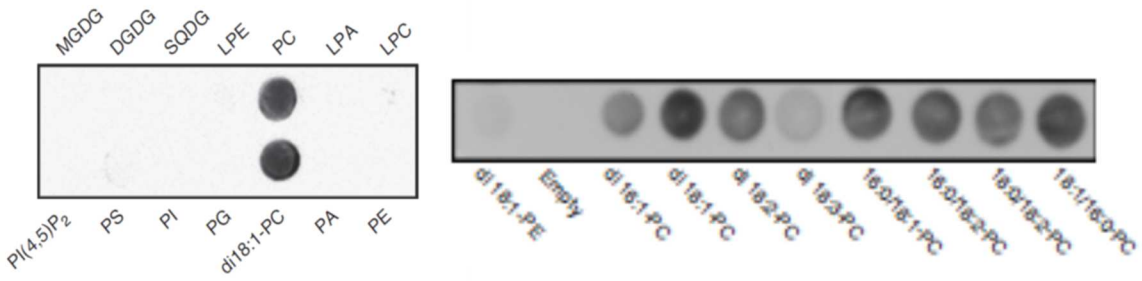


Figure 69 : Test d'interaction FT-lipide issu de (Nakamura et al., 2013). *Test d'interaction de la protéine FT purifié avec les différents lipides et les différentes formes de PC effectué par la technique du dot-blot.*

Dans ce contexte, nous nous sommes demandé quelle était l'influence d'ALA10 et des ALIS sur le déclenchement de la floraison. Nous avons analysé le déclenchement de la floraison dans les lignées exprimant ALA10, ALIS 1 et ALIS5 à différents niveaux: les lignées surexprimant ALA10, L1 et L2, les KOala10, KOalis1, KOalis5 et dans deux lignées surexprimant ALA10-GFP et ALIS1-CFP ou ALA10-GFP et ALIS5-CFP (nommées L2ALIS1 et L2ALIS5). Nous avons cultivé en jours longs (16h de lumière et 8h d'obscurité), ces différentes lignées en parallèles après synchronisation de la germination. Le déclenchement de la floraison a été mesuré en nombre de jours après la mise en culture en suivant l'apparition du bourgeon floral. De façon à éviter tout biais dû à des différences éventuelles de vitesse de développement des plantes, nous avons aussi compté le nombre de feuilles de chaque rosette à l'apparition du bourgeon floral (Figure 70).

L'analyse de ces résultats montre qu'en ce qui concerne le nombre de jours de culture au déclenchement de la floraison, la L2 présente une précocité significative par rapport aux lignées L2ALIS1, L2ALIS5, KOalis1 et KOalis5. Concernant le nombre de feuilles à la floraison, la L2 est significativement précoce par rapport au sauvage, au KOala10 et à la L2ALIS5. Le KOalis5 présente lui aussi une précocité par rapport au sauvage et au KOala10. Or, FT est produit et retenu dans un tissu non chlorophyllien, les cellules compagnons du phloème. Dans ces cellules, ALA10 est donc probablement majoritairement en association avec ALIS1 (Poulsen et al., 2015, Chapitre 1).

Ces résultats indiquent d'une part qu'en fonction du complexe ALA10-ALIS favorisé, l'effet sur le déclenchement de la floraison est différent. La surexpression d'ALA10 seule promeut une floraison précoce ce qui pourrait être due au fait que la L2 se comporte à l'inverse du mutant fad3+, en accumulant la PC18:2. De la même façon, la favorisation du complexe ALA10-ALIS1 dans le KOalis5 qui présente une plus faible quantité de PC18:3 présente une floraison précoce. D'autre part, on pourrait s'attendre à ce que la favorisation du complexe ALA10-ALIS5 dans le mutant KOalis1 et la L2ALIS5, du fait de l'augmentation de la PC 18:3 dans ces lignées (mesurée dans le KOalis1, et supposée dans la

L2ALIS5) engendre un retard de floraison par rapport au WT. Or ces deux lignées se comportent comme la lignée sauvage.

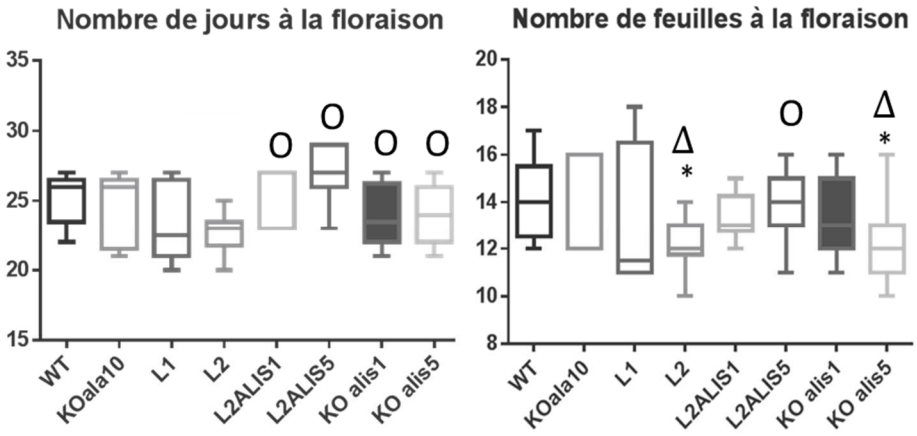


Figure 70 : Mesures relatives au déclenchement de la floraison. *Mesures effectuées sur cultures synchronisées, cultivées en jours long à 20°C. Les histogrammes représentent les premiers et troisième quartiles, la barre centrale représente la médiane, les barres d'erreurs représentent les valeurs extrêmes. Test statistique T-Test de student. *, Δ et O représentent une différence significative à p<0,05 par rapport au WT, KOala10, et à la L2 respectivement. N= 9, 5, 9, 10, 6, 7 pour WT, KOala10, L1, L2, L2ALIS1 et L2ALIS5 respectivement.*

Ces mesures sont préliminaires et nécessiteraient d'être effectuées sur un plus grand nombre de plantes. De plus, il est nécessaire de quantifier l'expression de FT, d'ALA10, des FAD, des ALIS, et des gènes régulés par FT dans les différentes lignées afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un effet pléiotropique. Ces résultats soulignent qu'ALA10 a des effets différents en fonction de l'ALIS avec laquelle elle interagit et que ces effets ne sont pas uniquement restreints au métabolisme lipidique. En effet, la précocité de floraison du KOalis5 n'est pas explicable par la seule désaturation de la PC, comme le montre l'absence de retard de floraison dans les lignées L2ALIS5 et KOalis1. Ainsi il se pourrait que ces phénotypes de déclenchement de la floraison observés ne soient pas dus uniquement aux perturbations de la désaturation de la PC. La localisation du complexe ALA10-ALIS1 au niveau de la membrane plasmique pourrait aussi favoriser les contacts et les échanges entre membrane plasmique et RE et avoir pour conséquence de favoriser le transfert de FT d'une cellule à l'autre.

.

5. Discussion

De façon générale, ces résultats sont encore préliminaires et un certain nombre d'expériences complémentaires sont nécessaires afin de pouvoir déterminer précisément l'influence des ALIS sur le rôle d'ALA10. Notamment, il est nécessaire de quantifier et de localiser l'expression d'ALA10 et des ALIS dans chacune des lignées, de même que l'expression des différents transgènes et de la protéine FT. Les observations de microscopie électronique sont à étendre aux lignées mutantes KO pour les ALIS, et l'utilisation de lignées surexprimant les ALIS dans un fond génétique sauvage et mutant pour ALA10 permettrait de s'assurer que les effets observés sont dus à l'association d'ALA10 avec l'une ou l'autre des ALIS. Néanmoins, cette étude permet de confirmer au moins partiellement nos hypothèses quant au fait qu'ALA10 a une fonction différente en fonction de l'ALIS avec laquelle elle interagit et au final, nous pouvons émettre un modèle de travail reliant la protéine ALA10, l'ultrastructure des

chloroplastes, l'homéostasie des lipides et le développement de la plante, ce qui est à ma connaissance une première concernant les ATPases de type P_4 chez la plante *Arabidopsis thaliana*.

L'analyse de la morphologie des chloroplastes a permis de mettre en évidence qu'ALA10, en fonction de l'ALIS interagissant avec elle, provoque des défauts de développement de chloroplastes. Il est possible que la surexpression d'ALA10 seule ou avec ALIS5 provoque une extension de l'enveloppe des chloroplastes au dépend de la synthèse des thylacoides, ce qui pourrait être du à un transfert dérégulé de PC depuis le RE vers l'enveloppe provoquant une extension de celle-ci. Nous avons aussi pu déterminer qu'ALA10 principalement avec ALIS5 promeut la formation ou le maintien des sites de contact entre RE et chloroplastes. De plus, ALA10 semble influer sur la partition du flux de carbone entre lipides membranaires et amidon. Cela pourrait être en lien avec la stimulation ALA10 dépendante de la production de MGDG et d'acides gras qui dériverait d'autant de flux de carbone issue de la photosynthèse de l'accumulation d'amidon vers la production de lipides.

L'analyse lipidique des plante mutantes pour les ALIS indique que conformément à l'hypothèse émise en conclusion du chapitre précèdent, ALA10 semble endosser différents rôles dans l'homéostasie lipidique en fonction de l'ALIS avec laquelle elle interagit. Dans les tissus photosynthétiques, ALA10 semblent interagir avec ALIS5 alors que dans les tissus non chlorophylliens, ALA10 interagit plutôt avec ALIS1. En effet, nous avons vu qu'alors que le complexe ALA10-ALIS5 favorise la synthèse et semble favoriser le processus de désaturation des acides gras à 18 atomes de carbone, le complexe ALA10-ALIS1 semble être défavorable à la désaturation du 18 :3. Dans les feuilles, les effets sur la désaturation et la synthèse de la PC pourraient être dû au fait que le complexe ALA10-ALIS5 favorise les contacts et donc les échanges entre chloroplastes et RE, ce qui améliorerait le processus d'acyl editing entre la PC du RE et la MGDG du chloroplaste. D'après les données d'analyses transcriptomiques, ALIS5 et ALIS1 ont d'ailleurs des optima d'expression séquentiels au cours de la nuit : ALIS5 est exprimée avant ALIS1 ce qui qui cohérent avec les données de (Nakamura et al., 2013) concernant les modulations des différentes formes de PC au cours de la nuit. L'expression séquentielle des ALIS avec ALA10 et le fait que l'expression de ces gènes soit corrélée avec les modulations des différentes formes de PC, suggèrent qu'ALA10 avec ALIS5 permet le maintien d'un pool de PC contenant des acides gras 18:2 au niveau des sites de contacts RE-chloroplastes pendant la nuit.

Nous avons aussi pu observer qu'ALA10 en fonction de l'ALIS avec laquelle elle interagit affecte le déclenchement de la floraison, la L2 et le KOalis5 favorisant une floraison précoce par rapport au sauvage et au KOala10. Ce qui pourrait être le résultat d'une part de la modulation de la désaturation de la PC dépendante d'ALA10, et d'autre part de l'augmentation des échanges entre membrane plasmique et réticulum lorsque le complexe ALA10-ALIS1 est favorisé.

Enfin, il est apparu lors des observations en microscopie confocale, au vu de l'analyse transcriptomique, et des différences marquées de l'impact d'ALA10 en fonction de la photopériode, qu'ALA10 est régulée transcriptionellement et probablement au niveau post-traductionnel en fonction de la photopériode. La recherche d'autre protéines interagissant avec ALA10 semble être la clef afin de déterminer, d'une part dans quelle mesure celle-ci est régulée post traductionnellement et, d'autre part si la favorisation des contacts et des échanges entre RE et chloroplaste est le fait de son activité catalytique ou d'un rôle de support d'échafaudage protéique.

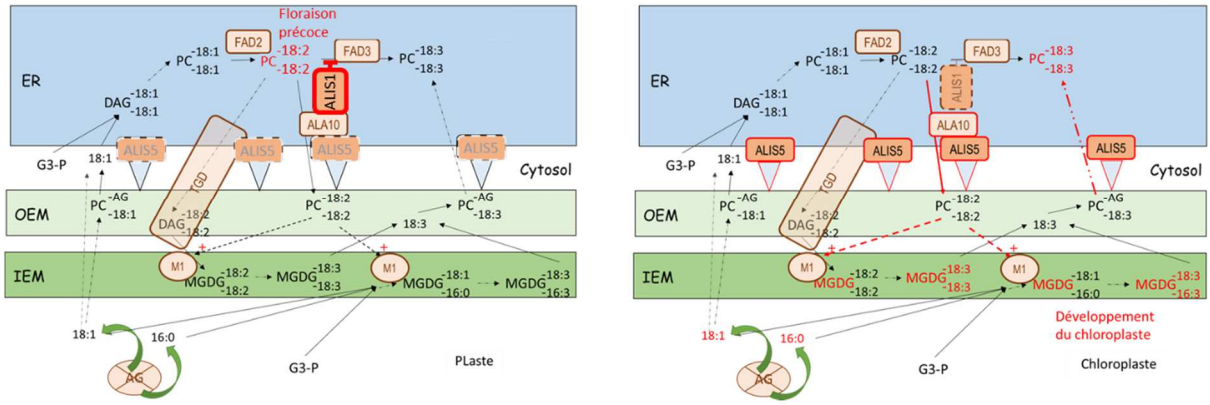


Figure 71 : Modèles hypothétiques concernant la fonction d'ALA10 en fonction d'ALIS1 et d'ALIS5*. A gauche: modèle concernant la favorisation du complexe ALA10-ALIS1 dans des tissus non photosynthétiques, à droite modèle concernant la favorisation du complexe ALA10-ALIS5 dans les tissus chlorophylliens. La sous unité cerclé en rouge est la sous unité majoritairement en association avec ALA10, les flèches rouges représentent l'impact d'ALA10, flèche plate inhibition, flèche pointue favorisation. La synthèse des acides gras se fait dans le stroma du plaste, les acides gras produit sont de forme 16:0 ou 18:1. Ils peuvent aller nourrir la synthèse des galactolipides, être exportés directement sous forme d'acyl-CoA, ou aussi être incorporés sur la lyso-PC au niveau de l'enveloppe du chloroplaste qui peut par la suite être hydrolysée et convertie en acyl-CoA. Ces acyl-CoA sont utilisés vers le RE ou ils nourrissent la synthèse de PC. Les acides gras de la PC sont désaturés séquentiellement par FAD2 puis FAD3 en 18:2 puis 18:3 et peuvent fournir la synthèse de PE par la voie de Kennedy. Alternativement la PC riche en 18:2 peut être la source du lipide transféré par le complexe TGD lequel nourri la synthèse des galactolipides en DAG d'origine eucaryote. Nous avons montré dans le premier chapitre que la PC riche en 18:2 pouvait, par l'intermédiaire d'ALA10, être transférée à l'enveloppe du chloroplaste où sa conversion putative en AP induit une activation de la synthèse de MGDG. D'après les résultats du chapitre 2, ce rôle est probablement soutenu par le complexe ALA10-ALIS5.*

Les analyses de lipide effectuées sur les mutants alis1 et alis5 ont révélé que la modulation du processus de désaturation semble être le fait du complexe ALA10-ALIS1, le mutant alis5 présentant une augmentation de la quantité de PC contenant des acides gras 18:2 (Figure 66 et 67). Il apparait aussi que le complexe ALA10-ALIS5 augmente le nombre de contacts et probablement les échanges entre RE et chloroplastes, ce qui se traduit par un transfert plus important de la PC 18:2 vers l'enveloppe du chloroplaste dans le cas où le complexe ALA10-ALIS5 est favorisé. Cette augmentation des transferts de PC intermembranaires, permettrait un accroissement de la quantité de PC 18:2 transférée vers le chloroplaste qui activerait à son tour la synthèse de MGDG favorisant le développement des chloroplastes. Mais cela favoriserait aussi une augmentation de l'acyl editing entre le MGDG 18:3 et la PC 18:2 ce qui pourrait expliquer, avec la défavorisation du complexe ALA10-ALIS1 et donc le dé-répression de l'activité de FAD3, l'accumulation de PC contenant des acides gras 18:3. Cette accumulation de forme finale de la désaturation de la PC pourrait engendrer le retard de floraison observé dans le cas du double surexpresseur L2ALIS5. Ce modèle, s'appuyant sur des données encore préliminaires doit encore être développé et enrichie suite à l'analyse lipidique des doubles surexpresseurs L2ALIS1 et L2ALIS5.

Chapitre III

La régulation post-traductionnelle d'ALA10

Comme nous l'avons vu, ALA10 peut être localisée dans le RE ou au niveau de la membrane plasmique en fonction de l'ALIS avec laquelle elle interagit. De plus, elle est impliquée dans la désaturation de la PC et dans la régulation de la synthèse des galactolipides. Son expression, combinée à celle des différentes ALIS, a un impact sur la morphologie des chloroplastes et sur le déclenchement de la floraison. Nous nous sommes interrogés sur les mécanismes permettant d'expliquer une telle multiplicité de rôles d'ALA10 et nous avons fait l'hypothèse qu'ALA10 pourrait tour à tour intervenir dans des processus différents dépendant de protéines avec lesquelles elle pourrait éventuellement interagir.

1. La recherche d'interactants d'ALA10

Pour rechercher les interactants possibles d'ALA10, en plus de FAD2 et des ALIS, un crible en double hybride a été mis au point avec la société Hybrigenics. ALA10 étant une protéine membranaire comportant plusieurs segments transmembranaires, l'utilisation d'un crible double hybride classique sur la protéine entière était impossible. Notre choix s'est donc dans un premier temps porté sur la technique du split ubiquitine plus adaptée aux protéines membranaires (Figure 72A). Cependant, il s'est avéré qu'ALA10 seule, active le système ubiquitine en levure, rendant également difficile l'utilisation de cette technique. Nous avons alors, dans un deuxième temps, utilisé la technique double hybride classique mais uniquement sur les 76 derniers acides aminés du fragment Cter d'ALA10 (Figure 72B). Notre choix s'est porté sur ce fragment car il est cytosolique et constitue la partie la plus divergente d'ALA10 vis-à-vis des autres ALA (0,017% d'identité avec les autres ALA alors que, sur les protéines entières, le taux d'identité se situe aux alentours de 12%). De plus, les domaines cytosoliques N et P n'ont pas de partenaires connus chez les ATPases de type P alors qu'il y a des interactions décrites pour la partie C-terminale, comme chez l'ATPase à protons de la membrane plasmique avec la protéine 14-3-3 ou PPI1 (Viotti et al., 2005). Ce fragment ALA10 Cter a été testé contre une banque de fragments de protéines d'*Arabidopsis* issus de rosettes de 15 jours, cette banque recouvrant plus de 6 fois le génome. 32 interactions ont été trouvées. Il est à noter que parmi ces positifs on ne retrouve ni FAD2, ni ALIS1 ou ALIS5. Les interactions positives ont été classées en fonction de leur fiabilité. Parmi les 32 interactions trouvées, une seule a été classée A, la classe la plus fiable (Figure 73). Dans ce cas, le fragment interagissant avec ALA10 appartient à la protéine PUB11, une protéine ubiquitine ligase de type E3.

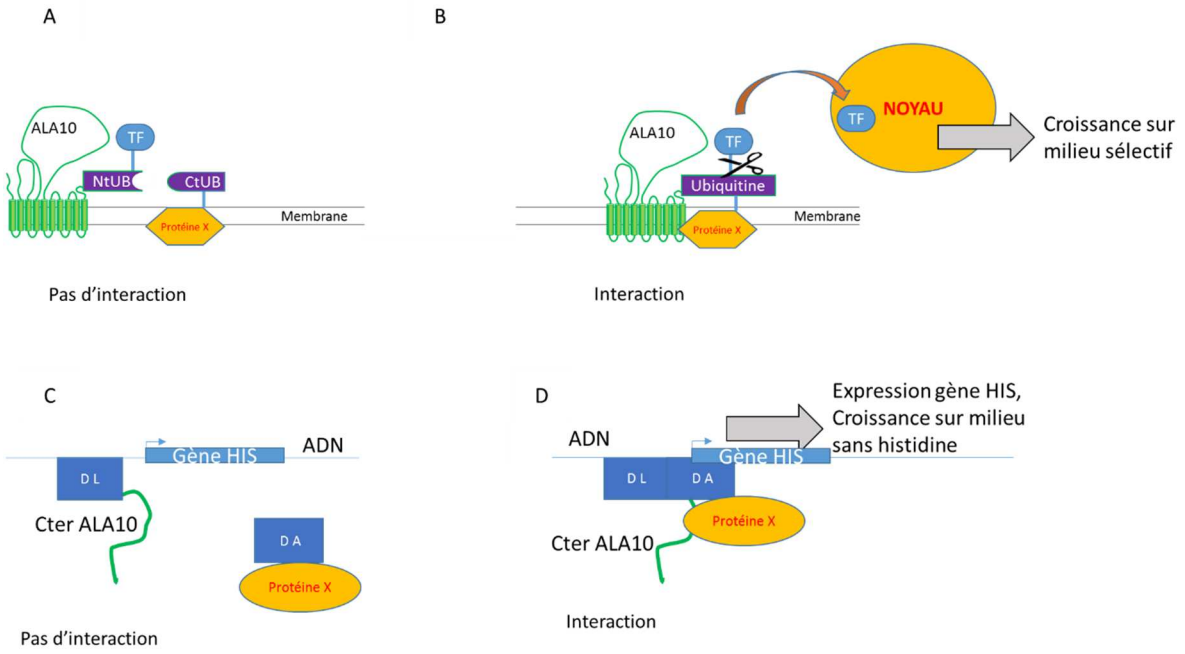


Figure 72 : Principe des cribles en double hybride utilisés. A et B. Split ubiquitine. *Le split ubiquitine permet de tester l'interaction de protéines membranaires. Le principe consiste en la coexpression de deux protéines fusion. Chaque candidat est fusionné soit avec la partie C-terminale de l'ubiquitine (CtUb), soit avec la partie N-terminale de l'ubiquitine (NtUb), elle-même fusionnée avec un facteur de transcription (TF) permettant l'expression d'un gène rapporteur. La protéine portant le facteur de transcription est nécessairement membranaire. Si les deux candidats n'interagissent pas (A), le facteur de transcription reste fusionné avec la protéine membranaire et ne peut donc pas activer l'expression du gène rapporteur. Dans le cas d'une interaction positive (B), l'ubiquitine peut être reconstituée, celle-ci est reconnue par le protéasome qui en dégradant la protéine qui le porte libère le facteur de transcription permettant l'expression du gène rapporteur et donc la croissance sur milieu sélectif.* ***C et D Double hybride classique.*** *Les deux protéines ou fragments de protéine sont nécessairement solubles est sont exprimés dans le noyau grâce à la fusion avec les domaines d'intérêt. Chaque candidat est fusionné soit avec le domaine de liaison à l'ADN (DL) de la protéine codée par GAL4, soit avec le domaine d'activation de la transcription de cette protéine (DA). S'il n'y a pas d'interaction entre les deux candidats (C), il ne peut y avoir activation de transcription du gène rapporteur permettant la croissance sur milieu sélectif. S'il y a interaction (D), la reconstitution de la protéine GAL4 permet la transcription du gène rapporteur et donc la croissance sur milieu sélectif.*

A

	Global PBS (for Interactions represented in the Screen)	Nb	%
A	Very high confidence in the interaction	1	3.1%
B	High confidence in the interaction	3	9.4%
C	Good confidence in the interaction	3	9.4%
D	Moderate confidence in the interaction This category is the most difficult to interpret because it mixes two classes of interactions : - False-positive interactions - Interactions hardly detectable by the Y2H technique (low representation of the mRNA in the library, prey folding, prey toxicity in yeast)	17	53.1%
E	Interactions involving highly connected (or relatively highly connected) prey domains, warning of non-specific interaction. The total number of screens performed on each organism is taken into account to set this connectivity threshold: 20 interactions to different bait proteins in our entire database for Human, 10 for Mouse, Drosophila and Arabidopsis and 6 for all other organisms. They can be classified in different categories: - Prey proteins that are known to be highly connected due to their biological function - Proteins with a prey interacting domain that contains a known protein interaction motif or a biochemically promiscuous motif	2	6.3%
F	Experimentally proven technical artifacts	6	18.8%

B

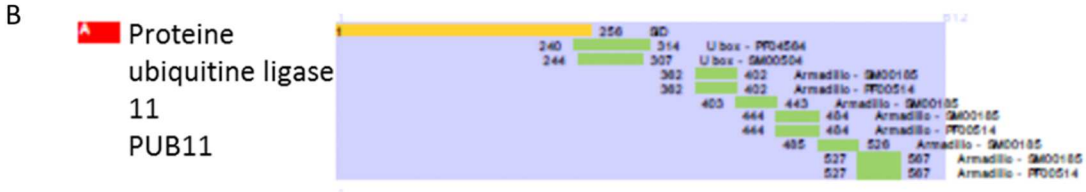


Figure 73 : Résultats du crible en double hybride réalisé par Hybrygénics*. A tableau récapitulatif des résultats. B présentation de l'interaction considérée comme la plus fiable. En bleu, longueur de la protéine totale, en jaune, le fragment minimal de PUB11 qui est commun aux 12 clones de PUB11 interagissant avec le fragment Cter d'ALA10, en vert, les fragments présentant des motifs reconnus bio informatiquement.*

L'ubiquitination est un mécanisme de première importance dans la régulation post-traductionnelle des protéines. Ce mécanisme intervient dans la dégradation spécifique des protéines et peut aussi conduire à des relocalisations ou des modulations de l'activité de protéine chez les plantes (Zelazny et al., 2011) (Figure 74). Une régulation possible d'ALA10 par ce type de mécanisme nous a semblé pertinente pour expliquer les multiples fonctions d'ALA10. Par ailleurs, différentes observations présentées dans les chapitres précédents nous suggèrent qu'ALA10-GFP pourrait effectivement subir une régulation post-traductionnelle *in planta*. En effet, d'une part, la quantité d'ALA10-GFP dans la L2 semblait relativement faible en comparaison de la quantité de transcrit dans cette lignée, de plus la détection du signal GFP en microscopie confocale paraissait dépendante du stade de développement et de l'heure de la journée alors que le promoteur exprimant ALA10-GFP est un promoteur viral fort et donc théoriquement peu sensible à des fluctuations lors du développement ou au cours de la journée. Pour ces raisons, nous avons concentré notre étude sur l'interaction ALA10-PUB11 et sur l'ubiquitination d'ALA10. Ces résultats, pour la plupart préliminaires, mettent au jour une régulation post-traductionnelle d'ALA10. Enfin (Maor et al., 2007) ont identifié un peptide appartenant à ALA10 dans le protéome ubiquitiné d'*Arabidopsis thaliana*.

2. PUB11, une ubiquitine ligase E3, interagit en levure et *in planta* avec ALA10.

Comme nous l'avons dit, PUB11 est une ubiquitine ligase de type E3. Ce type de protéine est impliqué dans la spécificité d'ubiquitination des protéines. Le système d'ubiquitination des protéines est constitué de 3 types de protéines: les E1 qui portent l'ubiquitine, les E2 qui activent l'ubiquitine pour sa fixation sur la protéine cible et les E3 qui assurent l'interaction spécifique avec la protéine cible (Nath and Shadan, 2009). L'ubiquitination en elle-même consiste en l'ajout d'une ou plusieurs protéines ubiquitine sur un ou plusieurs acides aminés (généralement des lysines) de la protéine cible. L'ubiquitine contient plusieurs lysines qui peuvent à leur tour être la cible d'ubiquitination donnant naissance à une chaine d'ubiquitines. Selon la ou les lysines de l'ubiquitine prise pour cible, les chaines

peuvent être de différentes formes et aboutir à différents effets pour la protéine cible (Figure 74). Le rôle classique de l'ubiquitination des protéines est l'adressage au protéasome 26S, ce qui entraine la dégradation de la protéine cible.

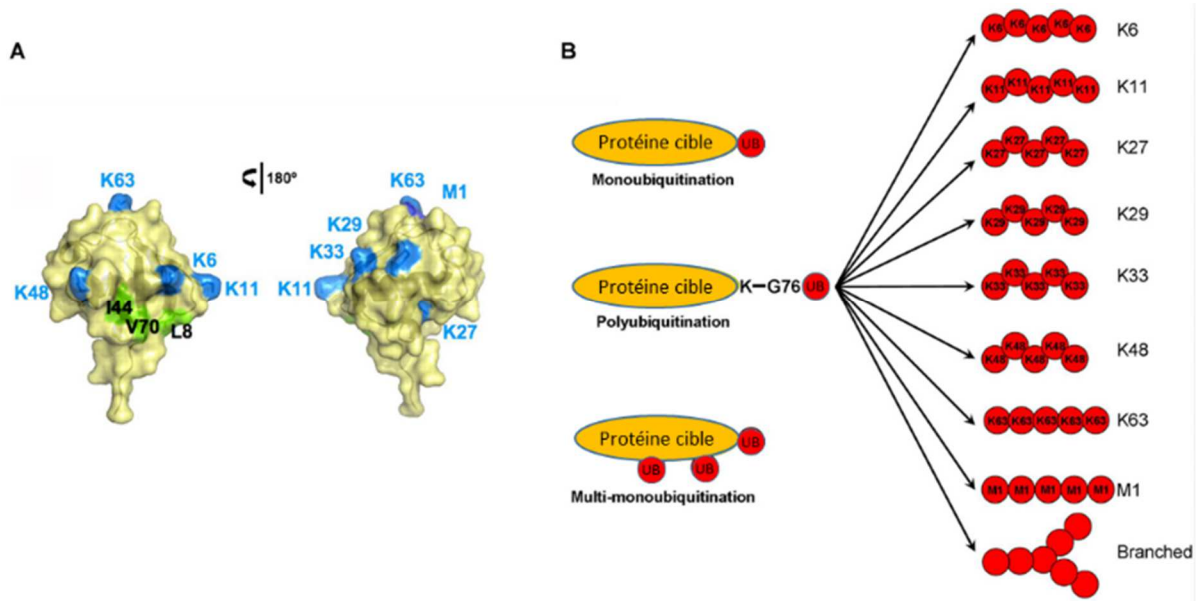


Figure 74 : Généralités sur l'ubiquitination. A. *Structure de l'ubiquitine. L'ubiquitine est une protéine globulaire de 76 KDa, Celle-ci contient 11 Lysines (K) en bleues, sur lesquelles peuvent se brancher d'autres ubiquitines aboutissant à la formation de différentes formes de chaines d'ubiquitines (B). Alternativement, les branchements peuvent se faire sur la partie Nter de l'ubiquitine composée des trois acides aminés en vert. Les différents types d'ubiquitination peuvent conduire à différentes conséquences pour la protéine cible telles que la dégradation, la relocalisation, l'inhibition des contacts protéine-protéine (Zelanzy et al., 2015).*

La confirmation de l'interaction entre ALA10 et PUB11 a d'abord été effectuée en double hybride en levure en utilisant le fragment Cter d'ALA10 utilisé pour le crible et la protéine PUB11 entière (Figure 75). La séquence codant pour le fragment Cter (1134-1202) d'ALA10 a été clonée en phase avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 (DBD), et la séquence codant PUB11 en phase avec le domaine d'activation de la protéine GAL4 (DA). Ces clonages ont été effectués respectivement dans les plasmides pB66 dérivé du plasmide pAS2ΔΔ (Fromont-Racine et al., 1997) et pB7 dérivé du plasmide pGADGH . Ces constructions ont ensuite été insérées dans des souches haploïdes de levure CG1945 (mata) et YHGX13 (Y187 ade2-101::loxP-kanMX-loxP, matα) respectivement. Ces deux plasmides permettent la croissance de ces souches de levure sur un milieu respectivement sans triptophane ou sans leucine.

Ce système permet, lorsque les deux protéines candidates interagissent, la production du gène HIS permettant la synthèse d'histidine. Ainsi, les levures étant par ailleurs mutantes pour l'activation du gène HIS endogène, l'interaction des deux protéines fusion est nécessaire à la survie et au développement des levures sur un milieu dépourvu d'histidine. L'ajout dans le milieu de 3-aminotrizole, un compétiteur du produit du gène HIS, permet une quantification relative de la force de l'interaction protéique. L'utilisation de vecteurs produisant les domaines d'activation et de liaison à l'ADN non fusionnés avec le Cter d'ALA10 ou PUB11, sont utilisés comme contrôle négatif. En contrôle positif, des protéines connues pour interagir sont utilisées (Smad3/Smurf1 Colland et al. 2004). Les souches diploïdes de levures obtenues par protocole de croisement (Fromont-Racine et al., 1997) exprimant les différentes combinaisons de constructions sont ensuite utilisées à différentes concentrations sur des milieux sélectifs : milieu contrôle pour la présence des deux plasmides (absence de tryptophane et de leucine), milieu de test d'interaction (absence de tryptophane, de leucine et

d'histidine) contenant des concentrations croissantes de 3-aminotrizole. Pour chaque paire, les tests ont été effectués sur deux clones obtenus indépendamment.

Cette expérience montre d'une part une croissance sur milieu contrôle sans tryptophane et sans leucine de toutes les combinaisons (Figure 75a) montrant que les différentes combinaisons de constructions sont bien présentes. Dans les tests sur milieu sélectif ne contenant pas de 3-aminotriazole, les levures exprimant les contrôles négatifs sont incapables de croitre mais les contrôles positifs et les souches exprimant les fusions ALA10-DBD et PUB11-AD croissent (Figure 75b). Sur milieu contenant 1 mM de 3-aminotriazole, le résultat est similaire (Figure 75c). Au-delà de 1mM de 3-aminotriazole, seul le contrôle positif croit (rapport complet d'Hybrigenics en annexe). Il apparait donc qu'ALA10 et PUB11 interagissent en levure mais que cette interaction n'est pas aussi forte que celle des protéines utilisées en témoin positif.

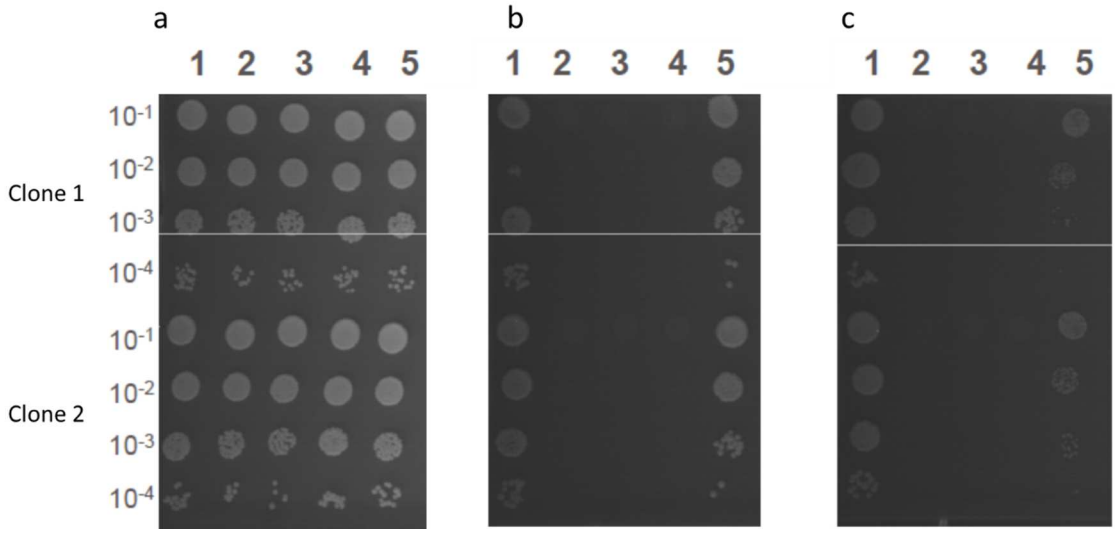


Figure 75 : Test d'interaction ALA10 Cter contre PUB11 en double hybride*. 1 Contrôle positif : Smad3/Smurf1 (Colland and Daviet, 2004), 2 Contrôle négatif : domaine de liaison seul contre domaine d'activation seul, 3. Domaine de liaison à l'ADN seul contre PUB11-domaine d'activation, 4. ALA10 Cter-domaine de liaison à l'ADN contre domaine d'activation seul. 5. ALA10 Cter-domaine de liaison à l'ADN contre PUB11-domaine d'activation. a: Contrôle positif sur milieu dépourvu de tryptophane et de leucine, b: Test d'interaction sans compétition, milieu ne contenant ni tryptophane ni leucine ni histidine, c: Test d'interaction avec compétition, milieu ne contenant ni tryptophane ni leucine ni histidine et contenant 1mM de 3-aminotriazole.*

Nous avons ensuite voulu vérifier qu'ALA10 et PUB11 interagissent *in planta.* Pour cela, nous avons testé l'interaction en BiFC, technique que nous avions utilisée pour tester l'interaction d'ALA10 avec les ALIS. Nous avons donc transfecté des protoplastes issus de feuilles d'*Arabidopsis* avec des plasmides permettant l'expression d'ALA10 et de PUB11 chacune fusionnées en Cter avec les parties Nter et Cter de la YFP. Les protoplastes ainsi transfectés ont été observés en microscopie confocale après incubation à température ambiante pendant un minimum de 16h. Pour chaque signal positif détecté, nous avons analysé le spectre d'émission de façon à éliminer les faux positifs (Figure 76). Nous avons ainsi pu observer un signal YFP dans les deux orientations de la YFP, confirmant l'interaction d'ALA10 avec PUB11. Il apparait donc qu'ALA10 peut interagir avec PUB11 en levure et *in planta.*

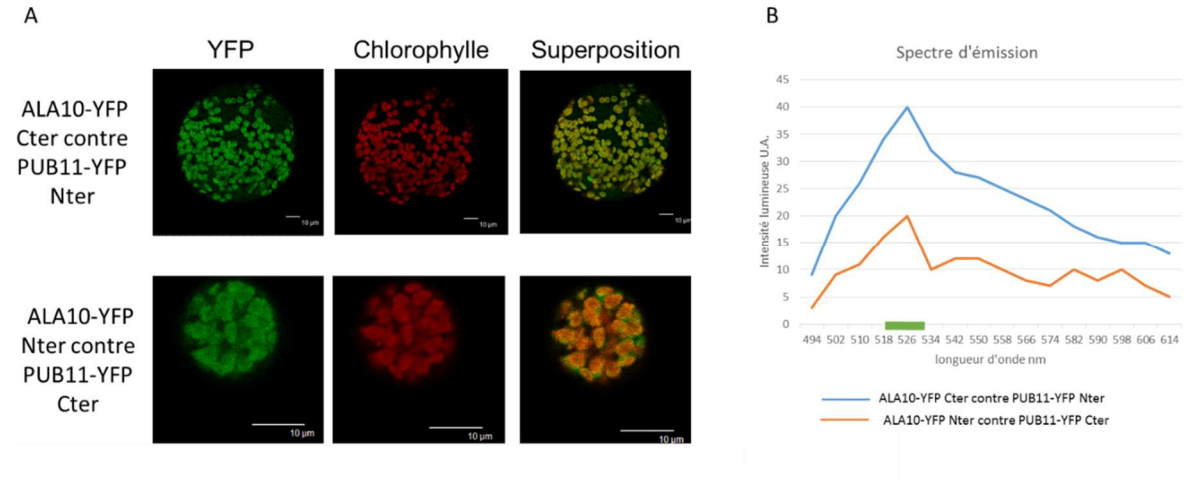


Figure 76 : Analyse des interactions ALA10/PUB11 par BiFC. *A : Observation en microscopie confocale de protoplastes 16 à 24 h après transfection avec les constructions indiquées. En vert et à gauche, la fluorescence reconstituée de la YFP, en rouge au centre, l'autofluorescence de la chlorophylle, à droite, superposition de la fluorescence de la YFP avec la fluorescence de la chlorophylle en rouge. B : Spectre d'émission représentatif des signaux obtenus avec les deux orientations de la YFP exprimés en unités arbitraires, intensités lumineuses normalisées par le nombre de pixels de la zone analysée. Le rectangle vert en abscisse situe le maximum d'émission théorique de la YFP. Barre d'échelle = 10µm, N=4 pour les deux orientations.*

3. La régulation post-traductionnelle d'ALA10.

a. La régulation transcriptonnelle d'ALA10 et PUB11

Pour qu'une protéine soit régulée post traductionnellement il faut qu'elle, et son régulateur, soient exprimés. Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'expression des gènes codant pour ALA10 et pour PUB11. L'interrogation des bases de données transcriptomiques disponibles sur EFP browser met en évidence que PUB11 est exprimée dans les feuilles et que, comme ALA10, dans les feuilles d'une trentaine de jours, elle est sujette à une régulation de son expression au cours de la journée (Figure 77). De façon intéressante PUB11 présente une expression en miroir par rapport à ALA10. En effet, alors qu'ALA10 a un optimum d'expression en début de nuit qui diminue ensuite progressivement au cours de la nuit, PUB11 a un optimum d'expression au début de la phase lumineuse puis son expression diminue progressivement au cours de la journée. Considérant la séquence d'ubiquitine ligase de PUB11 et son rôle possible dans l'adressage au protéasome 26S, nous avons émis l'hypothèse qu'ALA10 pourrait être régulée post-traductionnellement par PUB11 au cours de la journée. Plus PUB11 est exprimée, plus la protéine ALA10 serait dégradée, accentuant le cycle d'expression génique d'ALA10.

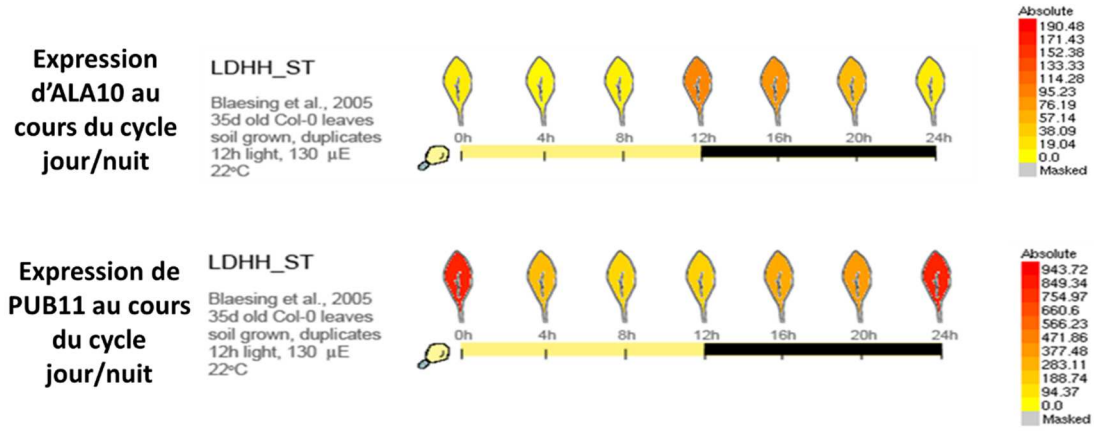


Figure 77 : Analyse de l'expression d'ALA10 et de PUB11 au cours du cycle circadien. *Mesures effectués sur les feuilles de rosette de 35 jours cultivées avec une photopériode de 12h de jours suivis de 12h de nuit. Les deux jeux de données sont tirés de (Blaesing et al 2005) regroupées par (Usadel et al., 2005). Les données sont présentées en valeur absolue de la quantité de transcrit.*

b. ALA10 est régulée post-traductionnellement au cours de la journée

Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé l'accumulation d'ALA10 à différents temps dans des plantules sauvages d'*Arabidopsis* de 10 jours. Nous avons analysé en parallèle des plantes traitées ou non au MG132, qui est un inhibiteur du protéasome 26S. Les plantes ont été cultivées en milieu liquide sur plaque 12 puits pour faciliter le traitement avec le MG132 (Voir Matériel et méthodes). Les temps auxquels les plantes ont été traitées et prélevées sont indiqués (Figure 78). Après extraction, les protéines membranaires ont été analysées par Western blot et la protéine ALA10 révélée avec un anticorps dirigé contre la protéine ALA10 native. L'anticorps anti ALA10 reconnaissant d'autres protéines, nous avons aussi effectué cette analyse sur des plantes KOala10 utilisées comme contrôle négatif de détection. Le marquage à l'anticorps anti-ALA10 sur le Western Blot (Figure 79) révèle plusieurs bandes assez faibles et une bande intense à 130kDa de même intensité dans tous les échantillons. La présence de ce signal fort chez les lignées KO ALA10 indique qu'il ne s'agit pas de la protéine ALA10. Les échantillons WT non traités présentent un signal faible autour de 136kDa, taille attendue pour la protéine ALA10, à 19h et 1h du matin (jour 9). Aux autres temps, on ne détecte aucun signal correspondant à la protéine ALA10. Cela pourrait suggérer qu'ALA10 est exprimée la nuit et dégradée la journée. De plus, après le traitement au MG132, ce signal est beaucoup plus fort à 7h et 13h, ce qui indique que l'inhibiteur a empêché la dégradation d'ALA10 par le protéasome 26S. Ces résultats mettent donc en évidence qu'ALA10 est dégradée par le protéasome 26S au cours de la journée.

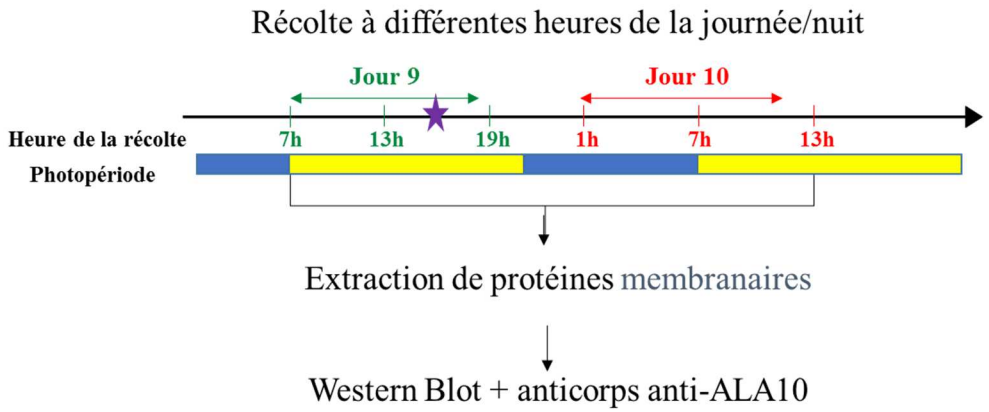


Figure 78 : Schématisation du protocole suivi pour le suivi de la quantité de protéine ALA10 au cours de la journée. *Les graines sont semées en milieu MS liquide avec 0,5 % de saccharose et cultivées jusqu'au jour 9. Aux jours 9 et 10, les rosettes sont collectées aux différentes heures décrites. Au jour 9 à 16h, (étoile violette) le milieu de culture est remplacé avec ou sans MG132, les barres jaunes représentent la période éclairée, la barre bleue représente la phase obscure.*

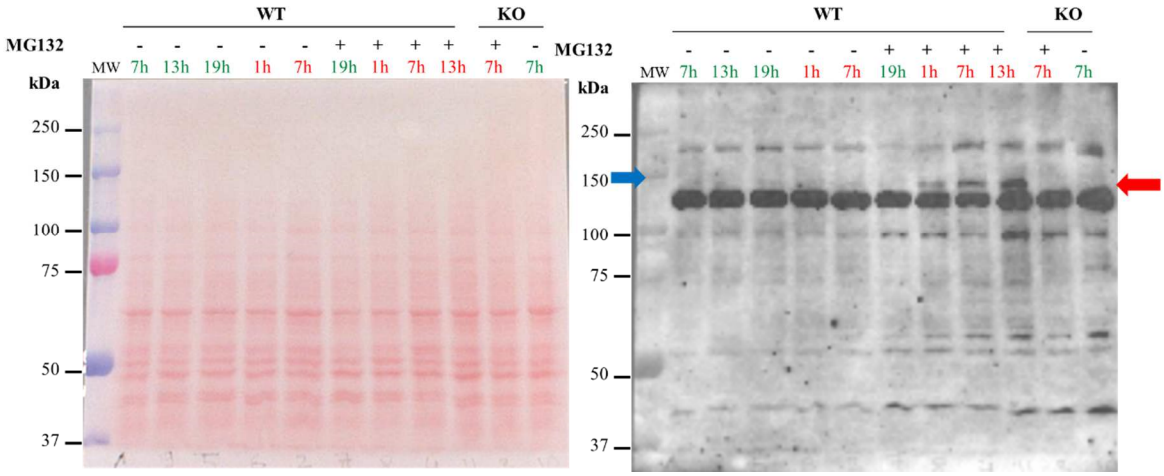


Figure 79 : Etude cinétique de l'accumulation de la protéine ALA10 au cours de la journée. *Les lignées sauvages (WT) et KOala10 ont été cultivées en milieu MS liquide contenant 0.5% de saccharose à 20°C selon le protocole de la Figure 78. La veille de la récolte à 16h, le milieu a été remplacé par un milieu neuf avec ou sans 50µM de MG132 ou dans 1% DMSO (solvant du MG132). Les protéines membranaires sont extraites et séparées sur un gel 10% d'acrylamide pendant 2h à 80V, avant transfert sur nitrocellulose. La coloration au Rouge Ponceau (gauche) permet de contrôler que la quantité de protéine est similaire dans tous les puits. La révélation est faite à l'aide de l'anticorps anti-ALA10 dilué au 100ème (droite). La révélation au Chemidoc (BioRad) a été effectuée après ajout d'une solution de péroxyde/luminol pendant 5min. Les heures de récoltes sont indiquées en vert pour le 9er jour et en rouge pour le 10ème jour. MW : marqueur de taille. La position attendue pour ALA10 est indiquée par une flèche rouge, la flèche bleue présente la position du marqueur de taille 150 KDa.*

c. L'ubiquitination d'ALA10

Nous avons donc voulu déterminer si ALA10 est ubiquitinée ce qui pourrait expliquer l'accumulation d'ALA10 en présence de MG132. L'ubiquitination des protéines provoquant leur dégradation, il est nécessaire d'inhiber le protéasome 26S pour pouvoir détecter la fraction de protéine ALA10 ubiquitinée. Nous avons pour cela utilisé les conditions de culture et de traitement au MG132 utilisé dans le paragraphe précédent dont on a vu qu'elles permettent une inhibition efficace de la dégradation d'ALA10. Pour tester l'ubiquitination d'ALA10, nous avons utilisé une lignée surexprimant ALA10-GFP, la L1. Nous avons choisi cette lignée car l'expression du trasgène est relativement proche de l'axpression de gène endogène, s'agissant d'experiences préliminaires nous avons voulu être certain de ne pas saturer le système ubiquitine protéasome. La fusion avec la GFP permet

l'immunopurification de la protéine ALA10-GFP, ce qui permet d'analyser ensuite l'ubiquitination de fractions de protéines membranaires enrichies en ALA10-GFP. Nous avons effectué le traitement au MG132 et l'immunopurification sur la lignée sauvage comme contrôle négatif d'immunopurification. Ainsi au terme de 9 jours de culture, les plantes L1 et sauvages ont été traitées ou non pendant 16h avec le MG132, les protéines membranaires ont ensuite été extraites et ALA10-GFP immunopurifiée avec un anticorps anti-GFP.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'efficacité du traitement au MG132 sur la stabilité d'ALA10-GFP. Nous avons donc analysé les extraits bruts de protéines membranaires extraites des plantes sauvage et L1 traitées ou non avec le MG132. Pour vérifier que la quantité de protéines déposées sur gel est équivalente pour chaque fraction, la membrane est colorée au rouge ponceau (Figure 80). Ensuite, la membrane est révélée avec un anticorps anti-ALA10 (Figure 80). Cette première révélation met en évidence un signal à 163 kDa, qui correspond à la taille attendue pour ALA10-GFP, dont l'intensité est plus forte dans les extraits correspondants aux plantes traitées au MG132 que dans les fractions correspondant aux plantes non traitées, comme c'était déjà le cas dans l'expérience précédente pour ALA10 endogène. Ainsi ALA10 est bien surexprimée dans la L1, et le traitement au MG132 inhibe la dégradation d'ALA10 dans la L1 comme dans le sauvage.

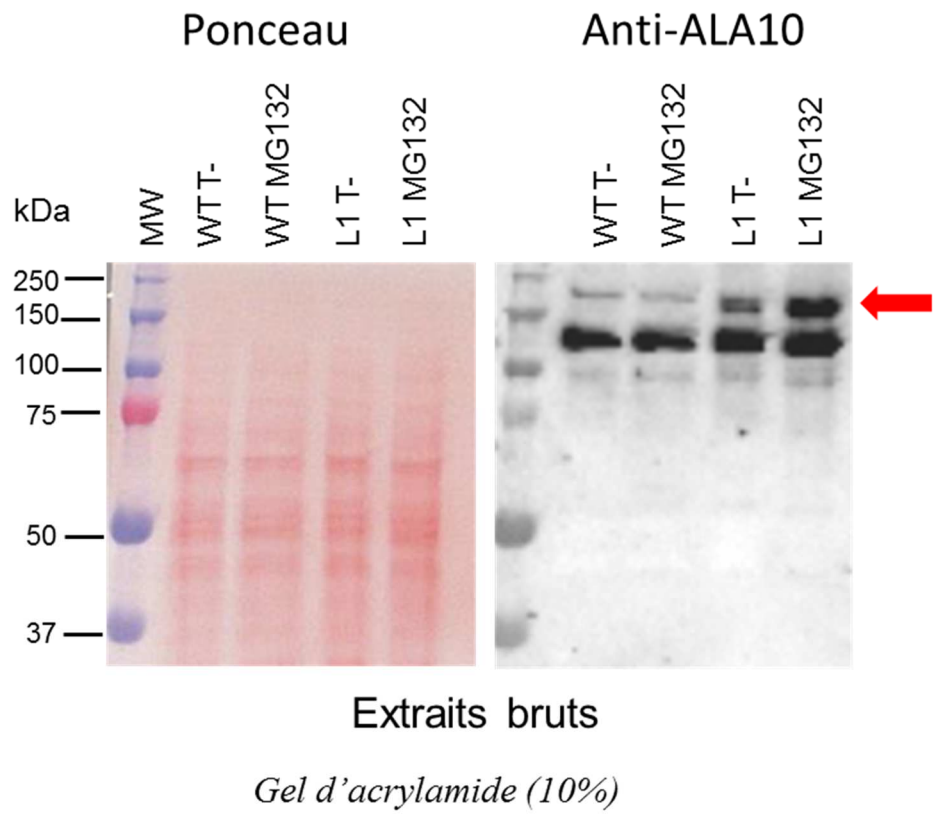


Figure 80 : Immunodétection par Western Blot d'ALA10 sur les protéines membranaires totales des lignées sauvage (WT) et L1, traité (MG132) ou non (T-). *Le même protocole de traitement que celui utilisé pour la cinétique a été employé, la récolte effectuée 24 heures après le début du traitement (15h). Les protéines membranaires sont séparées sur un gel 10% d'acrylamide pendant 4h à 100V. Le marquage est effectué avec l'anticorps anti-ALA10 dilué au 100ème MW : marqueur de taille. La position attendue pour ALA10-GFP est indiquée par une flèche rouge. ALA10 endogène ne peut être distinguée de la bande contaminante à 130kDa, par ailleurs de faibles bandes aspécifiques sont présentes dans les échantillons WT, qui étaient aussi présentes dans l'expérience précédente.*

Nous avons ensuite voulu vérifier que les bandes observées à 163KDa dans la L1 correspondent bien à ALA10-GFP. Pour cela, nous avons révélé, après dépôt des mêmes fractions sur un autre gel, la membrane avec l'anti-GFP (Figure 81). Sur cette membrane on retrouve dans les fractions correspondant à la L1 une bande vers 163kDa. Cette bande est absente des fractions WT ce qui indique qu'il s'agit bien d'ALA10-GFP. De plus, on voit que l'intensité de cette bande est beaucoup plus forte dans l'extrait correspondant aux plantes traitées au MG132 que dans l'extrait correspondant à la condition contrôle. Ainsi ce résultat confirme qu'ALA10 et ALA10-GFP sont plus abondantes en présence de MG132 et qu'elles sont donc probablement dégradées par le protéasome 26S dans la journée.

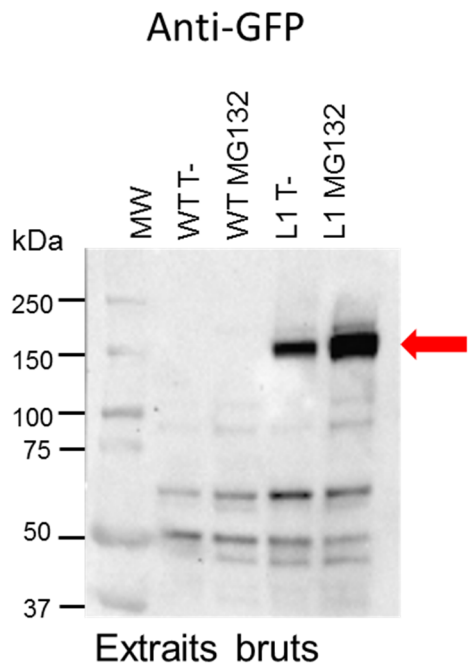


Figure 81 : Immunodétection par Western Blot d'ALA10-GFP sur les protéines membranaires totales des lignées sauvage (WT) et L1, traitées (MG132) ou non (T-). *Le même protocole de traitement que celui utilisé pour la cinétique a été employé, la récolte effectuée 24 heures après le début du traitement (15h). Les protéines membranaires sont séparées sur un gel gradient 4-20% d'acrylamide pendant 4h à 100V. Le marquage est effectué avec l'anticorps anti-GFP dilué au 5000ème MW : marqueur de taille. La position attendue pour ALA10-GFP est indiquée par une flèche rouge. On peut noter que les bandes aspécifiques révélées avec l'anticorps anti-ALA10 dans le WT ont disparu confirmant que la majorité du signal observé dans la L1 avec l'anticorps anti-ALA10 est bien ALA10-GFP*

Après avoir confirmé qu'ALA10-GFP est, comme la protéine native ALA10, sujet à une régulation post-traductionnelle, et que le MG132 inhibe la dégradation d'ALA10, nous avons procédé à l'immunopurification d'ALA10-GFP sur les mêmes extraits de protéines. Après l'immunopurification par des billes couplées à l'anti-GFP (Miltenyi), les extraits immunopurifiés ont été révélés par Western blot d'abord avec l'anticorps anti-GFP puis, après lavage de la membrane, avec l'anticorps anti-ALA10 (Figure 82). On peut voir que la révélation avec l'anticorps anti-GFP présente un signal à la taille attendue pour ALA10-GFP pour les immunopurifications de la L1 mais pas pour le sauvage, ce qui confirme que l'immunopurification a été spécifique. La révélation avec l'anticorps anti-ALA10 présente un profil similaire confirmant que le signal observé est bien celui d'ALA10-GFP et qu'ALA10 seule n'est pas retenue par les anticorps anti-GFP. De façon attendue, le signal obtenu avec les plantes traitées au MG132 est plus intense que dans l'extrait correspondant aux plantes contrôles.

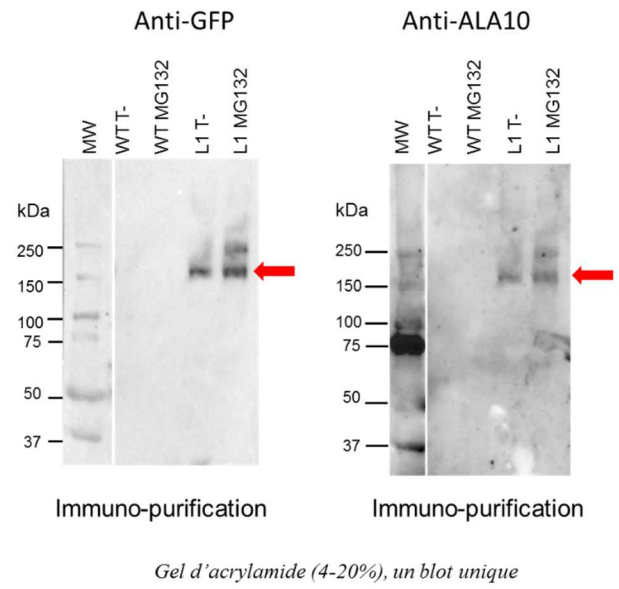


Figure 82 : Immunodétection par Western Blot d'ALA10 sur les protéines membranaires immunopurifiées des lignées sauvages (WT) et L1, traitées (MG132) ou non (T-). *Les extraits utilisés lors des blots des figures 80 et 81 ont été immunopurifiés sur colonne contenant des billes couplées à l'anticorps anti-GFP. Les protéines membranaires sont séparées sur un gel gradient 4-20% d'acrylamide pendant 4h à 100V. Le marquage est effectué avec l'anticorps anti-GFP dilué au 5000ème et, après lavage de la membrane, avec l'anticorps anti-ALA10 dilué au 100ème. MW : marqueur de taille. La position attendue pour ALA10-GFP est indiquée par une flèche rouge.*

Enfin pour savoir si ALA10-GFP est ubiquitinée nous avons effectué, après lavage, une troisième révélation de cette membrane avec l'anticorps anti-ubiquitine (Figure 83). Cette exposition a révélé la présence d'une bande aux alentours de 60KDa dans les immunopurifications de toutes les lignées ce qui suggère qu'une protéine contaminante et non liée à ALA10-GFP est reconnue par l'anticorps anti-ubiquitine. On observe par ailleurs un signal très faible autour de 163kDa spécifiquement pour la lignée L1 et traitée au MG132. La taille de ce signal correspond à une taille légèrement supérieure de la protéine ALA10-GFP comme on peut s'y attendre du fait de l'ajout d'une ou plusieurs ubiquitines sur ALA10 (Figures 83 et 84). Un signal plus fort a été obtenu à la même taille dans une autre immunopurification réalisée à partir d'une plus grande quantité de protéines de L1 traitée au MG132 (Figure 83). Cependant ce signal est, même dans ce cas, faible et a nécessité pour être détecté une exposition plus longue qu'avec les autres anticorps. La faiblesse du signal correspondant à ALA10-GFP ubiquitinée peut être dû au fait que l'anticorps utilisé qui reconnait l'ubiquitine est peu sensible, ou au fait que la proportion d'ALA10-GFP ubiquitinée est très faible par rapport à la quantité d'ALA10-GFP non ubiquitinée. Un séquençage de la bande obtenue au marquage anti-ubiquitine pourrait confirmer cette ubiquitination. De plus, on sait qu'il existe différents motifs d'ubiquitination, ainsi l'utilisation d'anticorps spécifiques de chacun d'eux, plus sensible que l'anticorps générique utilisé ici, pourrait valider cette ubiquitination.

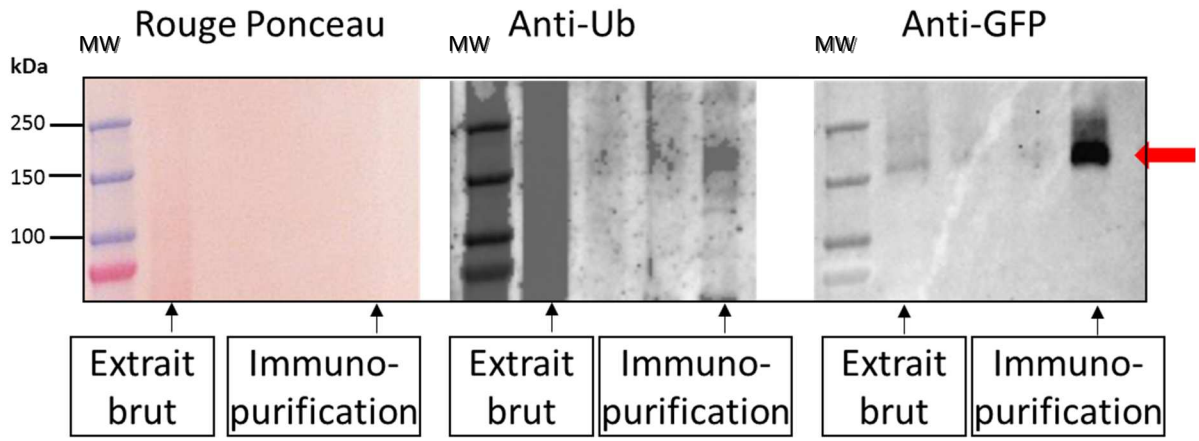


Figure 83 : Immunodétection par Western Blot des protéines ubiquitinées dans un extrait brut et une immunopurification de la lignée L1 traitée au MG132. *Coloration de la membrane au rouge ponceau, marquage à l'anticorps anti-Ubiquitine dilué au 1000ème, et marquage à l'anticorps anti GFP. MW: marqueurs de poids moléculaire. La position attendue pour ALA10-GFP est indiquée par une flèche rouge.*

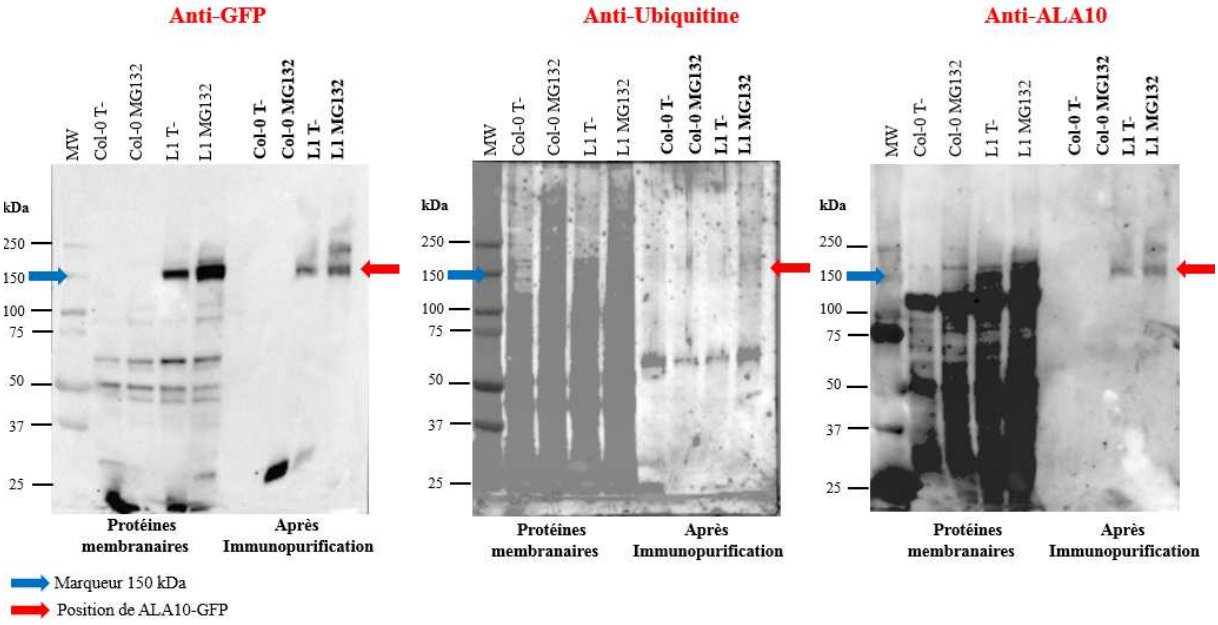


Figure 84 : Alignement des immunodétections de la GFP, de l'ubiquitine et d'ALA10 par Western Blot sur les protéines membranaires totales et immunopurifiées des lignées Col-0 et L1. *Le protocole des figures 80, 81 et 83 a été suivi pour obtenir ce résultat. Le même blot a été utilisé pour tous les marquages après différents lavages. La position attendue pour ALA10-GFP est indiquée par une flèche rouge. La flèche bleue indique la position du marqueur de 150 kDa.*

La figure 84 présente un alignement des blots précédemment présentés. On retrouve une bande de la même taille, 163kDa, pour tous les échantillons immunopurifiés, plus intense chez les lignées traitées au MG132. Le fait que toutes les révélations présentent un profil similaire, semble indiquer qu'ALA10-GFP est ubiquitinée et dégradée par le protéasome 26S.

d. PUB11 et la localisation d'ALA10

Nous avons vu qu'ALA10 interagit en levure et *in planta* avec PUB11, et qu'ALA10 est régulée par le protéasome 26S probablement par l'intermédiaire du système ubiquitine. Nous avons voulu déterminer si PUB11 est responsable de l'ubiquitination d'ALA10, pour cela nous avons transformé des plantes mutante KOpub11 (lignée SALK_029828 caractérisée par (Jung et al., 2015), dont nous avons

validé le génotype par PCR) avec le plasmide qui avait permis l'obtention des lignées surexpresseurs d'ALA10 précédemment utilisées. A l'origine, nous voulions répéter les expériences d'immunoprécipitation et d'analyse de l'ubiquitination d'ALA10 sur ces plantes, mais les transformations ayant été faites relativement tardivement au cours de ma thèse, à ce jour les lignées ne sont pas homozygotes pour ALA10-GFP. Cependant, nous avons pu observer les transformants primaires en microscopie confocale. Nous nous sommes intéressés à la localisation subcellulaire d'ALA10 car récemment, il a été montré que le système ubiquitine peut être impliqué dans la relocalisation de certains transporteurs dont BOR1, et IRT1, transporteur de bore et de fer respectivement (Zelazny et al., 2011). Ces observations ont d'abord révélé qu'ALA10-GFP est exprimée dans ces plantes mais ces observations ont aussi et surtout révélé que le signal est trouvé non seulement dans les endomembranes mais aussi avec dans des zones ponctuées plus intenses (Figure 85). L'utilisation d'un marqueur spécifique des mitochondries, Mitotracker, conjuguée à un traitement d'image utilisant le logiciel ImageJ, a permis de mettre en évidence que ces zones correspondent à des mitochondries (Figure 86). Cette localisation à la mitochondrie d'ALA10-GFP dans le KOpub11 suggère, dans l'hypothèse ou PUB11 ubiquitinerait ALA10, que lorsque l'ubiquitination d'ALA10 n'a pas lieu une partie au moins des protéines ALA10 serait adressée à la mitochondrie.

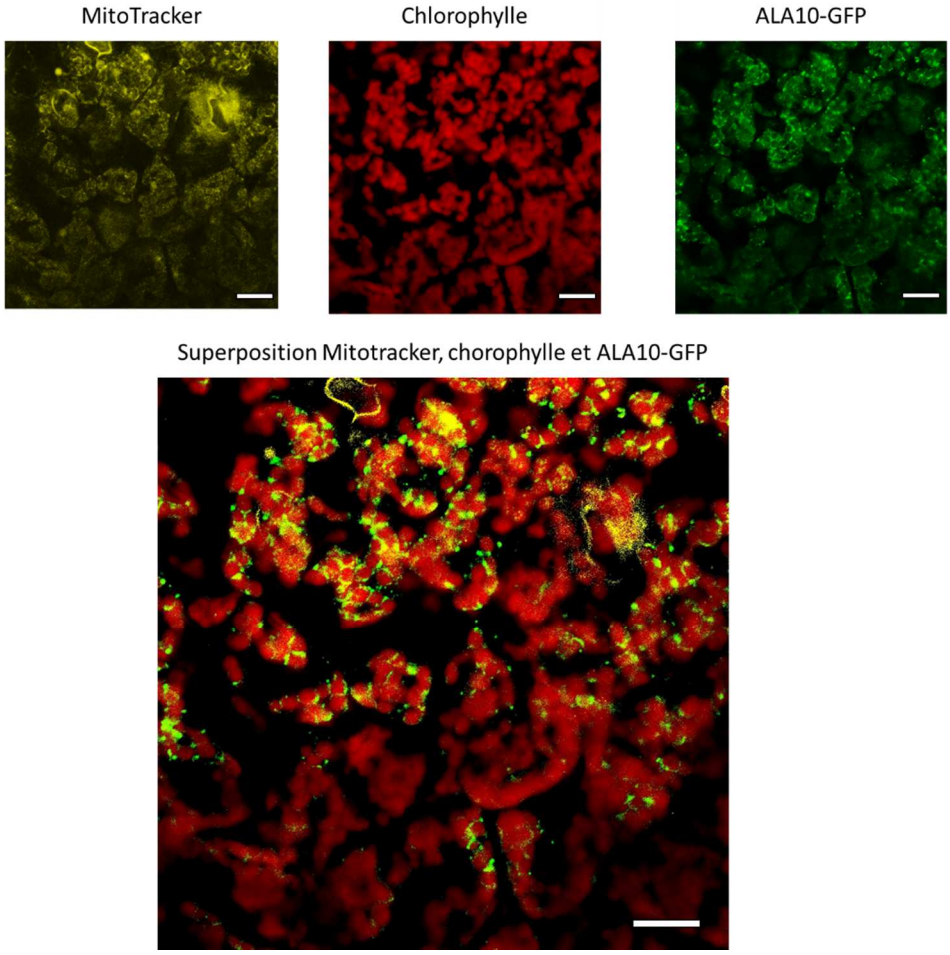


Figure 85 : Observation en microscopie confocale de cellules du mésophylle d'un transformant primaire pub11/ALA10-GFP âgé de 20 jours. *En haut : images obtenues pour chacun des différents canaux indépendant, en bas : la superposition des trois canaux. En jaune : fluorescence du MitoTracker, en rouge : autofluorescence de la chlorophylle, en vert : fluorescence de la GFP liée à la protéine ALA10-GFP. Les barres d'échelle représente 20µm.*

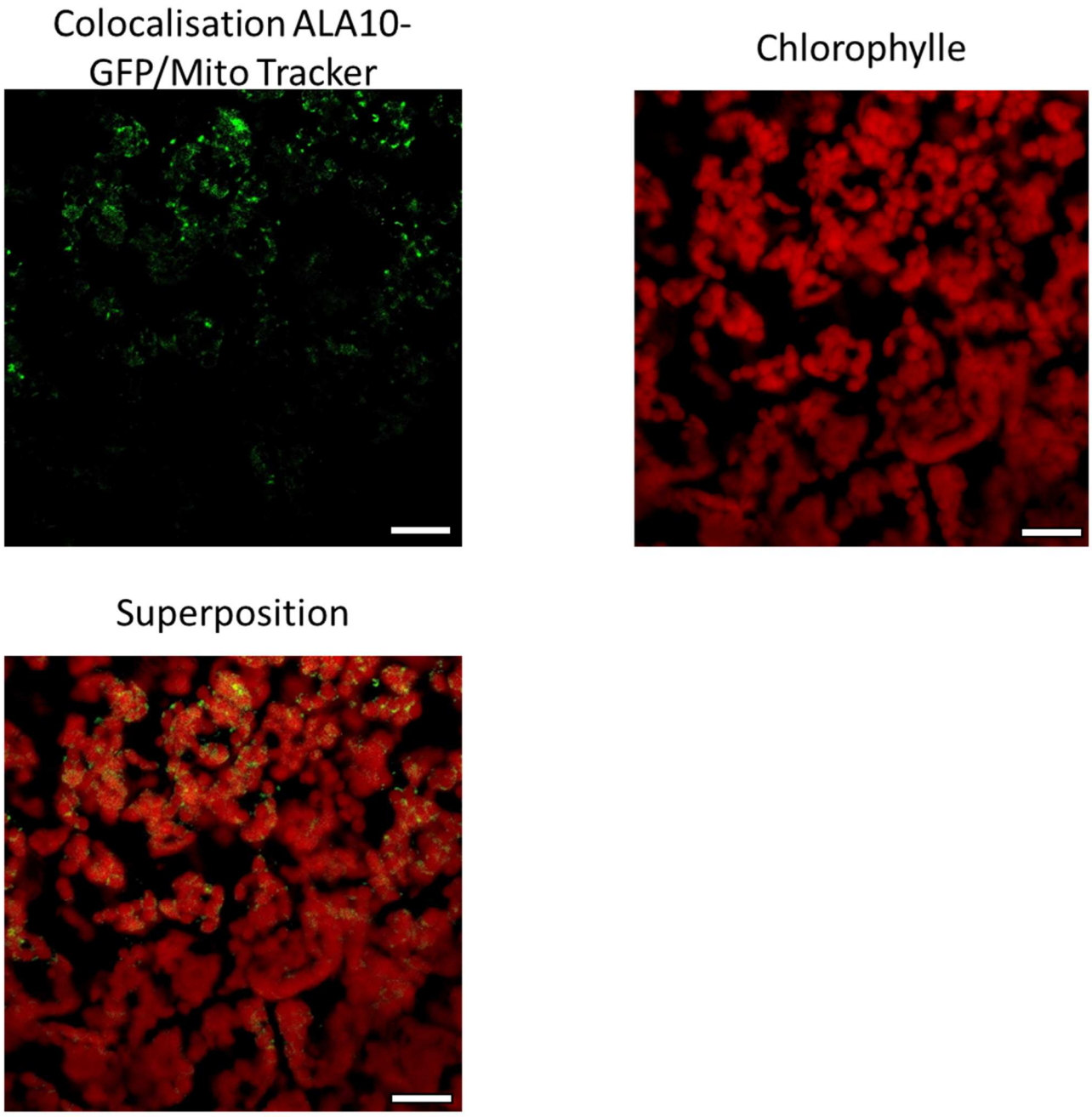


Figure 86 : Traitement d'image des images obtenues figure 85*. Les mêmes images que celles présentées figure 85 ont été traitées à l'aide du logiciel imageJ, le signal en vert correspond aux zones où le signal ALA10-GFP et le signal du MitoTracker se superposent (colocalisation), en rouge l'autofluorescence de la chlorophylle. Les barres d'échelle représente 20µm.*

Bien que surprenant par rapport aux observations présentées dans les chapitres I et II, ce résultat préliminaire fait écho aux premières observations d'ALA10-GFP faites dans la L2 lorsque les plantes sont soumises à une carence de phosphate. En effet, une étude préliminaire avant cette thèse avait montré qu'ALA10 est surexprimée dans les plantes soumises à cette carence de phosphate, cette carence étant par ailleurs connue pour provoquer un remodelage lipidique spectaculaire: le DGDG remplaçant la PC dans la mitochondrie, le tonoplaste ou la membrane plasmique. Les observations effectuées sur des plantes L2 soumise à la carence de phosphate avaient en effet mis en évidence qu'ALA10-GFP est localisée à la mitochondrie au moins en partie (Figure 87). De plus ces résultats sont

cohérents avec la présence d'un peptide d'adressage putatif à la mitochondrie comme exposé dans Résultats chapitre I.1.

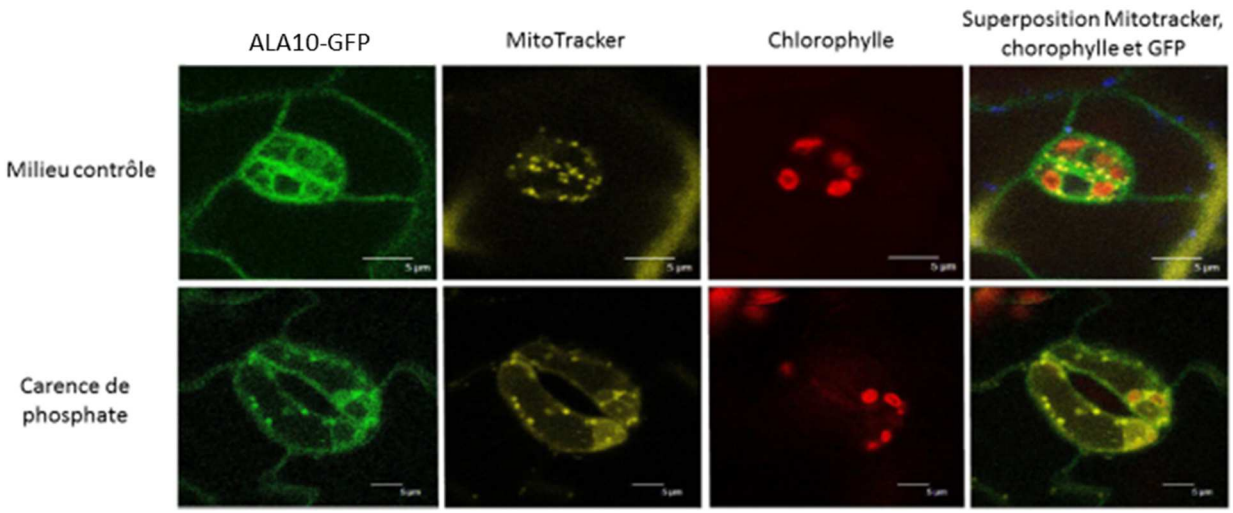


Figure 87 : Observation en microscopie confocale de cellules de gardes de plantes de la lignée L2 âgées de 15 jours, cultivées en milieu contrôle (première ligne) ou en carence de phosphate (deuxième ligne). *En vert : fluorescence de la GFP liée à la présence d'ALA10-GFP, en jaune : signal du MitoTracker, en rouge : autofluorescence de la chlorophylle.*

Ainsi ces résultats préliminaires suggèrent qu'en carence de phosphate ou lorsque la régulation post traductionnelle d'ALA10 est déficiente, ALA10 est adressée à la mitochondrie. Il est possible qu'une partie du pool de protéines ALA10 soit envoyée en permanence à la mitochondrie mais qu'elle soit dégradée après, par le protéasome 26S *via* une étape d'ubiquitination par PUB11. Il convient cependant de rester prudent sur cette hypothèse portant sur de résultats demandant à être répétés sur un plus grand nombre de plantes. De plus il serait bon de procéder à une purification des mitochondries dans les lignées KOpub11 et KOpub11/ALA10GFP et de s'assurer de la présence d'ALA10 et ALA10-GFP par Western blot.

4. Discussion

Ces travaux ont permis de montrer d'une part qu'ALA10 interagit avec PUB11 en levure et *in planta*. D'autre part, nous avons montré qu'ALA10 est exprimée transcriptionnellement préférentiellement la nuit. Nous avons suivi l'expression de la protéine ALA10 au cours d'un cycle de 24 heures et avons montré que de manière générale ALA10 est faiblement présente dans les feuilles. Grâce au traitement au MG132, nous avons montré qu'ALA10 est dégradée par le protéasome 26S pendant la journée. Le suivi de l'expression d'ALA10 demande à être répété et il est envisagé de reproduire cette expérience sur des plantes cultivées avec différentes photopériodes de façon à déterminer si l'expression du gène d'ALA10 et sa dégradation est circadienne ou dépendante de la photopériode. Par ailleurs, nous avons montré qu'ALA10-GFP est également dégradée par le protéasome 26S et qu'elle semble ubiquitinée, ce qui pourrait provoquer sa dégradation post-traductionnelle. Bien qu'un doute persiste sur l'ubiquitination d'ALA10 dû au faible marquage en Western Blot, il est envisagé de séquencer la bande immunopurifiée révélée avec l'anticorps anti-ubiquitine de façon d'une part à confirmer l'ubiquitination mais aussi à déterminer la ou les lysines ubiquitinées sur ALA10 ainsi que le type d'ubiquitination dont il s'agit. La détermination du type d'ubiquitination permettrait l'utilisation

d'anticorps spécifiques du type de chaine d'ubiquitine qui sont plus sensibles permettant d'affiner et de confirmer ces résultats. De plus, nous avons observé une localisation supplémentaire à la mitochondrie d'ALA10-GFP dans un contexte génétique KOpub11. Ce résultat préliminaire là encore, fait écho à de précédentes observations faites au sein de l'équipe concernant la localisation d'ALA10 lors de la carence en phosphate et suggère une possible fonction d'ALA10 à la mitochondrie dans ces conditions.

>ALA10

*MAGPSRRRRRLHLSKIYSYTCGKSSFQEDHSNIGGPGFSRVVY*CNEPGSPAAERRNYAGNYVRSTKYTVASFFPKSLF
EQFRRVANFYFLVTGILSLTDLSPYGAVSALLPLALVISATMVKEGIEDWRRKQQDIEVNNRKVKVHDGNGIFRQEE
WRNLRVGDIVRVEKDEFFPADLLLLSSSYEDSVCYVETMNLDGETNLKVKQGLEATSSLLNQDSDFKDFRGVVRCED
PNVNLYVFVGTLALEEERFPLSIQQILLRDSKLRNTEYVYGAVVFTGHDTKVIQNSTDPPSKRSRIERTMDKIIYLMFGL
VFLMSFVGSIIFGVETREDKVKNGRTERWYLKPDDADIFFDPERAPMAAIYHFFTATMLYSYFIPISLYVSIEIVKVLQSI
FINRDIHMYYEETDKPAQARTSNLNEELGMVDTILSDKTGTLTCNSMEFIKCSIAGKAYGRGITEVERAMAVRSGGS
PLVNEDLDVVVDQSGPKVKGFNFEDERVMNGNWVRQPEAAVLQKFFRLLAVCHTAIPETDEESGNVSYEAESPDE
AAFVVAAREFGFEFFNRTQNGISFRELDLVSGEKVERVYRLLNVLEFNSTRKRMSVIVRDDDGKLLLLSKGADNVMF
ERLAKNGRQFEAKTQEHVNQYADAGLRTLVLAYREVDENEYIEFNKSFNEAKASVSEDREALIDEITDKMERDLILLG
ATAVEDKLQNGVPECIDKLAQAGIKIWVLTGDKMETAINIGFASSLLRQEMKQIIINLETPQIKSLEKSGGKDEIELASR
ESVVMQLQEGKALLAASGASSEAFALIIDGKSLTYALEDEIKKMFLDLATSCASVICCRSSPKQKALVTRLVKSGTGKT
TLAIGDGANDVGMLQEADIGVGISGVEGMQAVMSSDIAIAQFRYLERLLLVHGHWCYSRIASMICYFFYKNITFGVT
VFLYEAYTSFSGQPAYNDWFLSLFNVFFSSLPVIALGVFDQDVSARFCYKFPLLYQEGVQNILFSWKRIIGWMFNGFI
SALAIFFLCKESLKHQLFDPDGKTAGREILGGTMYTCVVWVVNLQMALSISYFTWVQHIVIWGSIAFWYIFLMIYGA
MTPSFSTDAYMVFLEALAPAPSYWLTTLFVMIFALIPYFVYK**SVQMRFFPKYHQMIQWIRYEGHSNDPEFVEMVR
QRSIRPTTVGYTARRAASVRRSARFHDQIYKDLVGV***

Figure 88 : Annotation de la séquence protéique d'ALA10. Les 61 lysines, sites potentiels d'ubiquitination sont en rouge. La séquence en gras est le peptide utilisé pour le crible en double hybride, zone potentielle d'interaction d'ALA10 avec PUB11. En surbrillé violet une sequence commune avec les protéines MYC2-4 interagissant avec PUB11. En surbrillé vert des motifs répétés autour de lysines proches de cette zone, et *a priori* dans la partie cytosolique de ALA10. Le peptide surbrillé en gris; IIGWMFNGFISALAIFFLCK est le peptide ubiquitinylé d'après (Maor et al., 2007).

Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent qu'ALA10 est ubiquitinée par PUB11. Cependant pour valider cette hypothèse, il faudra répéter les expériences d'immunopurification et d'analyse par Western blot de l'ubiquitination d'ALA10 cette expérience sur les plantes exprimant ALA10-GFP dans un contexte mutant KOpub11 et montrer l'absence de dégradation d'ALA10-GFP dans ce mutant.

Que ce soit avec ou sans le concours de PUB11, ALA10 semble ubiquitinée et est régulée par le protéasome 26S au cours de la journée. Cette régulation est cohérente avec les résultats obtenus lors des analyses lipidiques présentées aux chapitres précédents qui mettent en évidence un impact fort de la photopériode sur l'effet de la mutation ou de la surexpression d'ALA10. Ces expériences avaient en effet montré que le phénotype des mutants KOala10 et KOalis5 ont un phénotype qui est plus important en jours courts qu'en jours longs.

Très récemment, il a été montré que PUB11 comme l'ubiquitine ligase la plus proche de PUB11, PUB10, est capable d'ubiquitiner in vitro MYC2, MYC3 et MYC4, qui sont des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation du jasmonate (Jung et al., 2015). L'alignement des séquences protéiques de la partie Cter d'ALA10, interagissant avec PUB11 en levure, avec ces protéines met en avant la présence de certains motifs communs qui pourraient éventuellement indiquer que PUB11

puisse avoir pour cible ces différentes protéines (Figure 88). L'étude de (Jung et al., 2015) a par cependant montré que si les mutants KOpub10 sont en effet affectés dans la signalisation du jasmonate, ce n'est pas le cas du mutant KOpub11. De plus, le double mutant KOpub10/KOpub11 ne présente pas de différences avec le mutant KOpub10. Néanmoins si PUB11 ubiquitinait à la fois ALA10 et des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation du jasmonate, PUB11 pourrait apparaitre comme une connexion entre la signalisation du jasmonate (MYC2, MYC3 et MYC4) et la signalisation lipidique (ALA10).

Chapitre IV

Conclusion: vers un nouveau modèle

1. Conclusion

Le but de cette thèse à l'origine était l'étude de l'implication de la protéine ALA10 dans l'homéostasie des galactolipides et sa caractérisation biochimique. L'intérêt porté à ALA10 est dû au fait que ce gène est surexprimé dans deux conditions impactant la synthèse des galactolipides: le traitement par la Galvestine-1, une drogue inhibant la synthèse du MGDG, et la carence de phosphate qui déclenche une forte synthèse des galactolipides.

Nous avons analysé dans un premier temps l'interaction d'ALA10 avec ses sous-unités beta potentielles et montré qu'ALA10 interagit *in planta* dans des cellules isolées du mésophylle avec ALIS1 et ALIS5. L'étude de la localisation de ces protéines à l'échelle subcellulaire a révélé que l'interaction avec ces sous unités se fait dans différentes parties des endomembranes: au niveau de la membrane plasmique avec ALIS1 et dans le réticulum endoplasmique à proximité directe des chloroplastes avec ALIS5. En parallèle, nous avons étudié le phénotype lipidique de lignées exprimant ALA10 à différents niveau: KOala10, surexpression modérée, forte surexpression. Cette analyse lipidique a montré d'une part, qu'ALA10 soutient la synthèse des galactolipides en stimulant le ratio MGDG/PC, sans favoriser la production de MGDG d'origine extraplastidiale. ALA10 semble donc avoir un effet activateur de l'activité de MGDG synthase sans apport supplémentaire de substrat. D'autre part, cette stimulation de la synthèse des galactolipides est accompagnée par une augmentation de la proportion de PC riche en 18:2 dans l'enveloppe des chloroplastes, suggérant qu'ALA10 est impliquée dans le transfert d'une certaine forme de PC vers l'enveloppe des chloroplastes. Nous avons ensuite découvert que dans les cellules en cultures une modification de l'expression d'ALA10, que ce soit une surexpression ou une disruption, diminue globalement la désaturation de la PC. De plus, la surexpression d'ALA10 augmente le ratio de l'efficacité de FAD2 sur l'efficacité de FAD3. Ce dernier résultat nous a poussé à rechercher si ALA10 pouvait interagir avec ces désaturases. L'approche par BiFC a confirmé les travaux de (Lou et al., 2014) montrant l'interaction de FAD2 avec FAD3, mais aussi de montrer qu'ALA10 interagit avec FAD2 et non avec FAD3.

Ces premiers résultats nous ont permis d'émettre un premier modèle de travail. Ce modèle, développé à la fin du premier chapitre de résultat (Figure 47), propose qu'ALA10 en interagissant avec FAD2 limite l'accès de FAD3 à la PC riche en 18:2 en flippant celle-ci après sa désaturation. La localisation d'ALA10 avec ALIS5 dans le réticulum à proximité des chloroplastes pourrait faciliter le transfert vers le chloroplaste de cette espèce intermédiaire de PC. Une fois dans l'enveloppe des plastes, la PC riche en 18:2 pourrait être convertie en AP lequel est connu pour activer MGD1 (Dubots et al., 2010). Cette dernière étape pourrait être effectuée par PLDγ1 qui se trouve avoir une bonne corrélation d'expression avec ALA10.

Par la suite, nous avons voulu exprimer ALA10 chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Lactococcus lactis* afin de caractériser biochimiquement ALA10. Cependant l'expression en levure, dont le but principal était de déterminer le substrat d'ALA10, a été publiée par (Poulsen et al., 2015). Cette étude a montré entre autre qu'ALA10 flippe principalement la PC mais aussi dans une moindre mesure la PS, la PE et la lyso-PC. L'expression en *Lactococcus lactis*, qui est une bactérie dépourvue de PC, aurait pu permettre la caractérisation biochimique d'ALA10, malheureusement nous n'avons jamais réussi à obtenir les vecteurs exprimant ALA10 dans cette bactérie, ce qui nous a poussés à réorienter notre recherche sur l'effet de l'interaction d'ALA10 avec les ALIS et sur la recherche d'autres interactants d'ALA10.

Pour étudier l'effet de l'interaction des ALIS sur la fonction d'ALA10, nous nous sommes intéressés en premier lieu à l'expression d'ALA10 et des ALIS. Cette étude bioinformatique a révélé que l'expression

d'ALA10 et d'ALIS5 semble être régulée au cours du cycle jour/nuit avec une expression préférentielle en début de nuit alors que l'expression d'ALIS1 semble ne varier que faiblement. Nous avons ensuite généré des plantes exprimant ALIS1-CFP ou ALIS5-CFP dans le fond génétique L2 qui surexprime ALA10-GFP. Dans un premier temps, l'observation en microscopie confocale de ces plantes a permis de confirmer les données précédemment obtenues concernant la localisation de ces protéines, à savoir une localisation au niveau de la membrane plasmique avec ALIS1 et dans le réticulum endoplasmique à proximité directe des chloroplastes avec ALIS5. De façon intéressante, dans les cellules du mésophylle, le signal GFP est beaucoup plus faible dans la lignée L2ALIS1 que dans la lignée L2 suggérant une expression plus faible ou une régulation post-traductionnelle. Ces observations ont aussi révélé que les chloroplastes semblaient affectés dans leur morphologie en fonction de l'ALIS coexprimée avec ALA10. Afin de vérifier cette observation, nous avons observé ces lignées en microscopie électronique à transmission ce qui nous a permis d'observer que la morphologie des chloroplastes est fortement affectée dans les lignées L2 et L2ALIS5. En effet, dans ces lignées, l'enveloppe des chloroplastes semble être distendue par rapport aux thylacoïdes, alors que les lignées L2ALIS1 et KOala10 ne présentent pas ce phénotype. Nous avons aussi pu voir que la surexpression d'ALA10 avec l'une et l'autre des ALIS augmente le nombre de contacts entre le RE et les chloroplastes. Ces résultats obtenus sur des transformants de deuxième génération demandent encore à être confirmés et l'expression relative des ALIS et d'ALA10 doit aussi être quantifiée.

Par la suite, pour déterminer si l'une ou l'autre des ALIS a un effet spécifique sur la fonction d'ALA10, nous avons analysé le profil lipidique des lignées KOalis1, KOalis5, KOala10 et L2 cultivées en parallèle. Au vu des données d'expression qui mettent en avant le fait que les gènes d'ALA10 et d'ALIS5 sont exprimés pendant la nuit, nous avons effectué les cultures dans des conditions de jours courts et de jours longs afin de déterminer si la durée du jour a un impact sur le phénotype lipidique de ces lignées. De façon intéressante, tous les phénotypes observés sont plus marqués en jours courts, et semblent moins prononcés en jours longs, suggérant qu'ALA10 et ALIS5 sont effectivement régulées par la photopériode. L'observation de ces lignées à 15 jours de croissance a d'abord révélé un fort retard de croissance à ce stade de la lignée KOalis5 par rapport à toutes les autres lignées.

L'analyse du profil lipidique, en particulier, le profil d'acide gras de la PC, bien que partielle et nécessitant d'être reproduite et étendue, révèle qu'ALA10 pourrait être impliquée dans des processus différents du métabolisme des lipides en fonction de l'ALIS interagissant avec elle. En effet, dans les feuilles, le phénotype du surexpresseur d'ALA10 (L2) est similaire au KOalis1 et inversement, le phénotype du KOala10 est plus proche de celui du KOalis5, suggérant que, dans les tissus verts, ALA10 est majoritairement en association avec ALIS5.

Lorsque le complexe ALA10-ALIS5 est favorisé, comme dans le cas du KOalis1 ou de la L2, il pourrait favoriser la production et l'export d'acides gras à 18 atomes de carbone du chloroplaste, permettant la production de PC et de MGDG et un développement foliaire plus rapide. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le KOalis5 présente une quantité d'acides gras 18:2 et 18:3 ainsi qu'une quantité de PC très fortement diminuée, ces deux phénotypes étant liés par le fait que les acides gras au niveau du réticulum sont principalement incorporés et désaturés sur la PC. En revanche, l'effet d'ALA10 sur la désaturation de la PC exposée au chapitre I, a été observé dans des tissus non chlorophylliens, et il semble qu'elle est le fait du complexe ALA10-ALIS1 qui pourrait défavoriser la formation de formes finales de désaturation et la désaturation en 18:3 de la PC comme dans le KOalis5. Cette hypothèse est soutenue par le fait que, dans les tissus chlorophylliens, ALA10 est plutôt localisée

à proximité des chloroplastes, donc en association avec ALIS5, alors que dans l'épiderme ou les racines, ALA10 est localisée à proximité de la membrane plasmique, donc probablement en association avec ALIS1. Le fait qu'ALA10 module différemment le métabolisme de la PC en fonction de l'ALIS qui interagit avec elle, nous a amenés à rechercher si le déclenchement de la floraison est lui aussi impacté par les modulations de l'expression de ALIS et d'ALA10. En effet, comme exposé dans le chapitre 2, les travaux de (Nakamura et al., 2014b) ont révélé que la protéine FT, responsable du déclenchement de la floraison, est produite dans des cellules non chlorophylliennes et se fixe au niveau du RE sur la PC non totalement désaturée, mais ne se fixe pas sur la PC désaturée 36:6. En conséquence, le mutant fad3^{+} surexprimant FAD3 présente un retard de floraison (Nakamura et al., 2014b). Le suivi de déclenchement de la floraison sur les lignées ALA10 et ALIS, bien que nécessitant d'être effectué à nouveau sur un plus grand nombre de plantes, semble être cohérent avec les résultats de l'analyse lipidique. En effet, nous avons aussi pu observer qu'ALA10 en fonction de l'ALIS avec laquelle elle interagit affecte le déclenchement de la floraison, la L2 et le KOalis5 favorisant une floraison précoce par rapport au sauvage et au KOala10. Ceci pourrait être le résultat d'une part de la modulation de la désaturation de la PC dépendante d'ALA10, et d'autre part de l'augmentation des échanges entre membrane plasmique et réticulum lorsque le complexe ALA10-ALIS1 est favorisé. On pourrait cependant s'attendre à ce que le KOalis1, plus riche en PC 36:6, ait, comme le mutant fad3^{+}, une floraison nettement retardée, ce qui n'est pas le cas par rapport au sauvage. Il est possible que d'autres protéines puissent compenser la perte d'ALIS1 relativement à l'effet d'ALA10 sur la désaturation de la PC ou relativement aux échanges entre RE et membrane plasmique favorisant le transfert du florigène FT jusqu'aux cellules du méristème apical. Au final, il est nécessaire de reproduire cette expérience sur un plus grand nombre de plantes, et de quantifier l'expression d'ALA10, des ALIS et de FT dans toutes ces lignées pour pouvoir confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux autres partenaires protéiques potentiels d'ALA10, ce qui a débouché sur la révélation de la régulation post-traductionnelle d'ALA10. La recherche d'interactants nous a conduits à faire effectuer un crible en double hybride en utilisant la partie Cter cytosolique d'ALA10. Ce crible nous a permis d'identifier 6 interactants de bonne fiabilité et un seul de très bonne fiabilité. Ce dernier est une ubiquitine ligase de type E3, PUB11, qui nous a particulièrement intéressés suite aux indices que nous avions obtenus quant à la régulation post traductionnelle d'ALA10. En effet, nous avions remarqué qu'entre les deux lignées surexprimant ALA10, la différence dans l'expression de la protéine était relativement faible alors qu'il y a un rapport de 10 dans l'expression de l'ARNm entre ces deux lignées. Ensuite, dans ces lignées, ALA10-GFP est exprimée sous le contrôle d'un promoteur fort: le promoteur viral 35S qui est sensé promouvoir l'expression du transgène de façon relativement constante au cours du développement. Or, l'observation du signal GFP associé à ALA10-GFP dans la L2 n'est détectable que dans les premiers stades de croissance. L'analyse des données transcriptomiques concernant PUB11, notamment son expression au cours de la journée, est cohérente avec un rôle de régulateur d'ALA10. En effet, PUB11 est aussi exprimé différentiellement au cours du cycle jour/nuit, mais présente un schéma d'expression en miroir par rapport à celui d'ALA10: une forte expression en début de journée qui diminue et devient nulle en fin de journée.

Nous avons donc confirmé l'interaction entre la partie Cter d'ALA10 et PUB11 en double hybride chez la levure, puis sur les deux protéines entières *in planta* par une approche en BiFC. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'expression de la protéine ALA10 et à sa possible dégradation par le protéasome 26S dont la fonction est le recyclage des protéines ubiquitinées. Nous avons donc suivi l'expression

d'ALA10 sur des plantes sauvages traitées ou non avec le MG132, un inhibiteur du protéasome à ubiquitine. Cette expérience a mis en évidence d'une part qu'ALA10 s'accumule principalement pendant la nuit et est dégradée pendant la journée mais aussi que cette dégradation est le fait du protéasome 26S. Nous avons voulu déterminé si ALA10-GFP est aussi dégradée par le protéasome 26S ce qui s'est avéré être le cas. Cela nous a permis d'immunopurifier ALA10-GFP et de vérifier son ubiquitination. Les résultats de cette dernière expérience nécessitent d'être reproduits, répétés avec d'autres anticorps plus spécifiques et plus sensibles, et confirmés à l'aide du séquençage des protéines révélées avec l'anticorps anti-ubiquitine. Cependant, ils suggèrent très fortement qu'ALA10-GFP est bien ubiquitinée.

Enfin, nous avons obtenus en fin de thèse des plantes surexprimant ALA10-GFP dans un contexte mutant pour PUB11 (KOpub11). L'obtention de ces lignées, à l'origine créées pour déterminer si l'ubiquitination d'ALA10 est dépendante de PUB11, nous a permis d'observer en microcopie confocale la localisation d'ALA10-GFP dans ce contexte génétique. De façon surprenante, le signal GFP est apparu comme étant enrichi dans ce qui s'est avéré être les mitochondries. Ce résultat préliminaire fait écho aux toutes premières observations concernant la localisation d'ALA10-GFP dans la L2 dans des plantes en condition de carence en phosphate. Ce résultat n'avait pas été approfondi à ce moment mais semble indiquer une fonction nouvelle pour ALA10 et indique un rôle de PUB11 et du système ubiquitine dans la localisation d'ALA10. De plus, de récentes études ont montré que le système ubiquitine n'est pas seulement impliqué dans la dégradation des protéines mais aussi dans la régulation de l'interaction des protéines ou encore leur relocalisation (pour revue (Dikic et al., 2009; Zelazny et al., 2011).

2. Un modèle spatial et temporel.

Dans leur ensemble, les résultats de cette thèse nous permettent de proposer un modèle de travail permettant de rendre compte de la fonction d'ALA10 dans l'homéostasie lipidique des cellules chlorophylliennes. Ce modèle prend en compte d'une part l'impact d'ALA10 sur la synthèse de MGDG et la désaturation de la PC par son interaction avec FAD2, d'autre part l'impact des ALIS sur la localisation d'ALA10 et l'effet de ces interactions différentielles sur le métabolisme des lipides, enfin comment la régulation d'ALA10 au cours de la journée permet d'expliquer son rôle dans le métabolisme de la PC et des lipides en général dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*.

Dans les cellules photosynthétiques (Figure 89), la quasi-totalité de la synthèse des acides gras s'effectue au cours de la journée (Browse et al., 1981; Nakamura et al., 2014a; Ohlrogge and Jaworski, 1997; Szymanski et al., 2014). La néo synthèse d'acides gras et leur export sous forme d'acyl-CoA enrichissent le pool d'acyl-CoA en acides gras 18:1, ces acides gras entrent ensuite dans la synthèse de la PC qui se trouve enrichie en 18:1. La PC est ensuite désaturée séquentiellement par FAD2 et FAD3, ce qui produit des formes de PC riches en 18:2 et 18:3. La désaturation des acides gras par FAD2 et FAD3 étant plus lente que la synthèse des acides gras (Mei et al., 2015), on peut s'attendre à une augmentation de la proportion de PC peu désaturée (riche en 18:1) par rapport à la PC riche en 18:3 pendant la journée en accord avec les résultats de (Nakamura et al 2013). La PC transférée aux chloroplastes est principalement de la PC riche en 18:2 et 18:3 (Bates, 2016; Botella et al., 2016). Par ailleurs, nos résultats suggèrent que cette PC 18:2 pourrait avoir un rôle activateur sur MGD1, en étant convertie en AP par une PLD (Botella et al 2016). En parallèle, un transfert du squelette DAG de la PC vers la voie de synthèse des galactolipides, par le système TGD, permettrait de nourrir en DAG la voie de synthèse eucaryote des galactolipides.

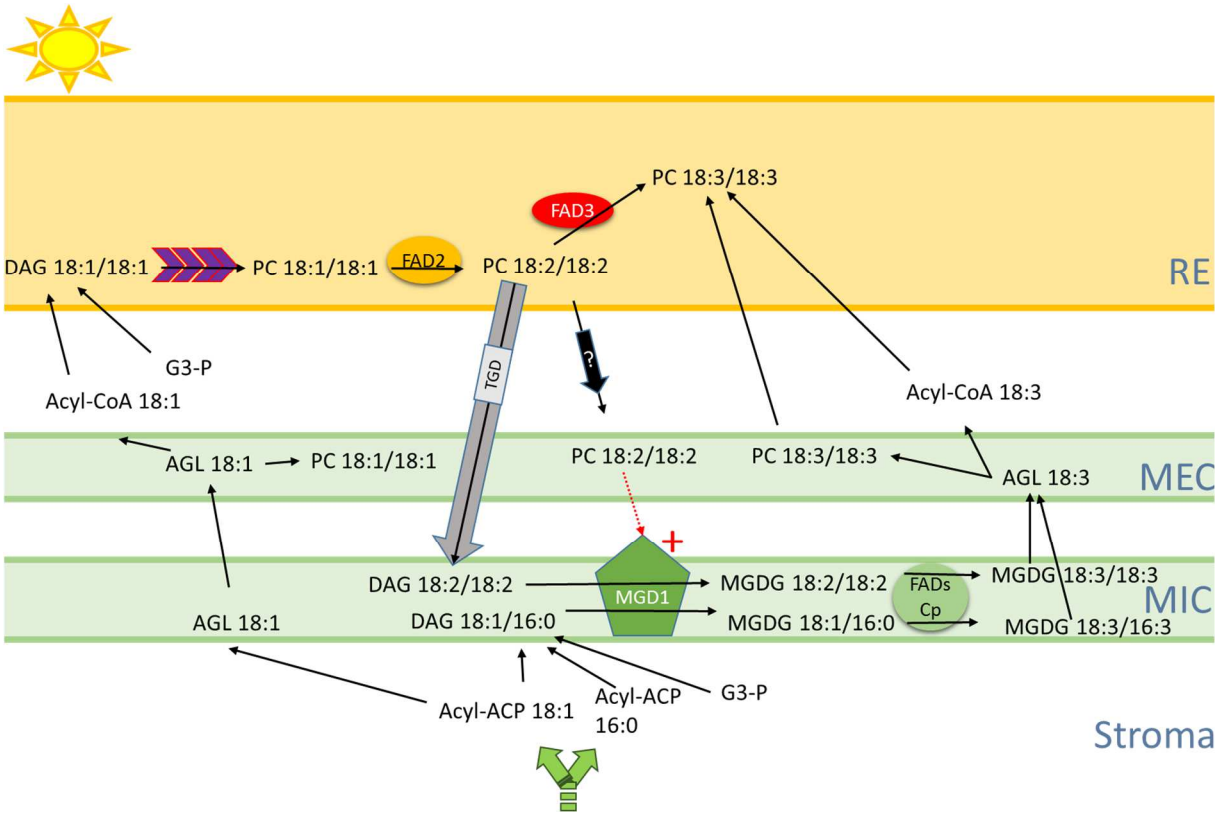


Figure 89: Schéma de l'homéostasie lipidique entre MGDG et PC dans les cellules photosynthétiques pendant la journée en absence d'ALA10. *Pendant la journée la synthèse des acides gras (double flèche verte) est alimentée par la photosynthèse, ce qui produit des acyl-ACP 16 :0 et 18:1. Les acides gras peuvent être soit incorporés sur du G3-P donnant du DAG qui alimente la synthèse du MGDG, alternativement ces acides gras, principalement 18:1, sont libérés sous forme d'acides gras libres et peuvent diffuser ou être transférés à l'aide de FAX1 à l'enveloppe externe. Dans l'enveloppe externe ces acides gras peuvent être utilisés pour former de la PC à l'aide de la lyso-PC, ou être convertis par LACS9 en acyl-CoA et être libérés dans le cytosol puis être utilisés dans la synthèse du DAG dans le réticulum. Le DAG ainsi produit est utilisé pour la synthèse de PC (flèches multiple violettes), la PC sera ensuite désaturée par FAD2 et FAD3 formant de la PC18:2 et de la PC18:3. Une partie de la PC 18:2 peut être transféré par un mécanisme inconnu vers le chloroplaste ce qui d'après le modèle donné chapitre 1 (Figure 47) peut stimuler l'activité de MGD1. Le MGDG produit dans le chloroplaste est désaturé par les désaturases chloroplastiques, et les acides gras désaturés peuvent être transmis à la PC par le jeu de l'acyl–editing entre la PC chloroplastique et le MGDG. Les flèches noires représentent les transferts de lipides, la flèche discontinue rouge marquée d'un + représente une activation. Légende des symboles donnée ci-après, commentaire donné dans le texte.*

En début de nuit, dans les cellules photosynthétiques (Figure 90), la photosynthèse s'arrête et l'apport d'acide gras néo synthétisé dans la synthèse de la PC diminue (Browse et al 1981, Ohlrogge et al 1997, Nakamura et al 2014, Szymansky et al 2014). Les FAD continuent cependant d'être exprimées et la proportion de formes finales de désaturation de la PC et de MGDG augmente. Et alors que les gènes de la voie de synthèse procaryote sont inhibés (Szymansky et al 2014), la production de galactolipides n'est pas affectée, continuant d'être alimenté par les squelettes DAG de la PC, comme attesté par l'augmentation du ratio de galactolipides eucaryote/procaryote (Figure 56 chapitre II, (Shen et al., 2010). Ainsi, les sites de contact doivent être maintenus pendant la nuit pour permettre cet apport de DAG eucaryote. Au vu du fait qu'ALA10 est exprimée préférentiellement la nuit et qu'elle limite la désaturation de la PC 18:2 en PC 18:3 en interagissant avec FAD2, on peut faire l'hypothèse selon laquelle ALA10 préférentiellement associée à ALIS5 dans ces cellules serait localisée à proximité des chloroplastes. ALA10 pourrait alors limiter une désaturation trop importante de la PC au niveau des sites de contact RE-chloroplaste, ce qui favoriserait les échanges de PC riche en 18:2 entre le RE et les chloroplastes. Cette PC riche en 18:2 transférée au chloroplaste pourrait jouer le rôle d'activateur de

la synthèse de MGDG, en étant convertie en AP possiblement par PLDγ1. Enfin, la favorisation des sites de contact entre RE et chloroplaste et l'apport en PC riche en18:2 dans l'enveloppe des chloroplastes pourrait favoriser l'acyl-editing entre PC et MGDG ce qui aboutirait *in fine* à une augmentation globale de la désaturation de la PC, cette dernière incorporant les acides gras issus de la désaturation du MGDG.

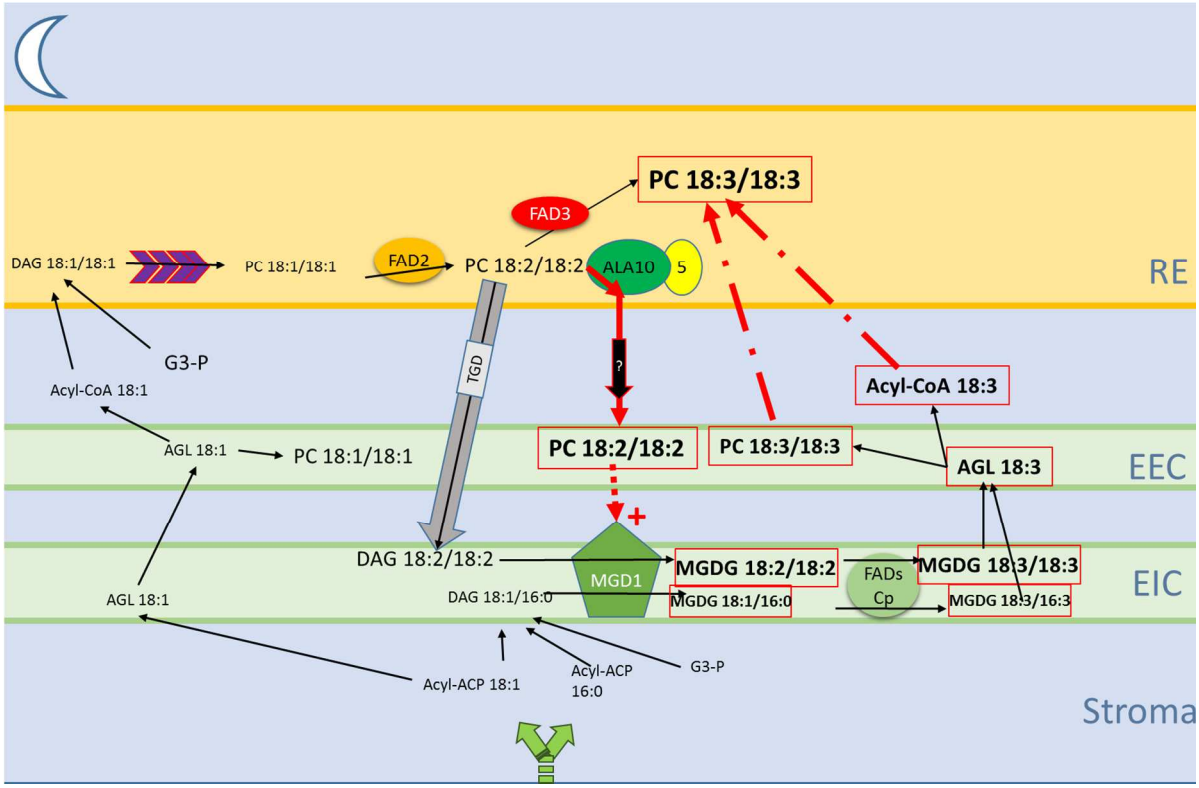


Figure 90 : Schéma de l'homéostasie lipidique entre MGDG et PC dans les cellules photosynthétiques pendant la nuit quand ALA10 est présente et en association avec ALIS5. *Avec l'arrêt de la photosynthèse, la néosynthèse des acides gras est quasi nulle. ALA10-ALIS5 accroit les échanges de PC18:2 vers le chloroplaste ce qui stimule MGD1 et donc la synthèse des galactolipides alimentée en DAG par le système TGD. Par ailleurs, les désaturases sont produites et actives en continu ce qui provoque une accumulation de PC 18:3 résultant d'une part de la désaturation de la PC par FAD2 et FAD3, mais aussi de l'acyl-editing entre MGDG et PC qui pourrait être favorisé avec l'augmentation des sites de contacts entre chloroplastes et réticulum endoplasmique promut par ALA10-ALIS5. Les flèches noires représentent les transferts de lipides, la flèche discontinue rouge marquée d'un + représente une activation les flèches rouges sont les transferts induits directement par ALA10 les flèches en pointillés discontinus sont les transferts indirectement induits par ALA10. Légende des symboles donnée ci-après, commentaire donné dans le texte.*

Dans les cellules peu ou non photosynthétiques (Figure 91), ALA10, interagissant principalement avec ALIS1, ne favoriserait plus les contacts RE-chloroplaste, diminuant d'autant l'acyl éditing entre MGDG et PC, mais continuerait de limiter la désaturation de la PC par FAD3. Cette diminution ne serait alors plus compensée par l'acyl-éditing ce qui expliquerait le phénotype de diminution de désaturation de la PC dans les cellules en culture observé Résultats chapitre I.

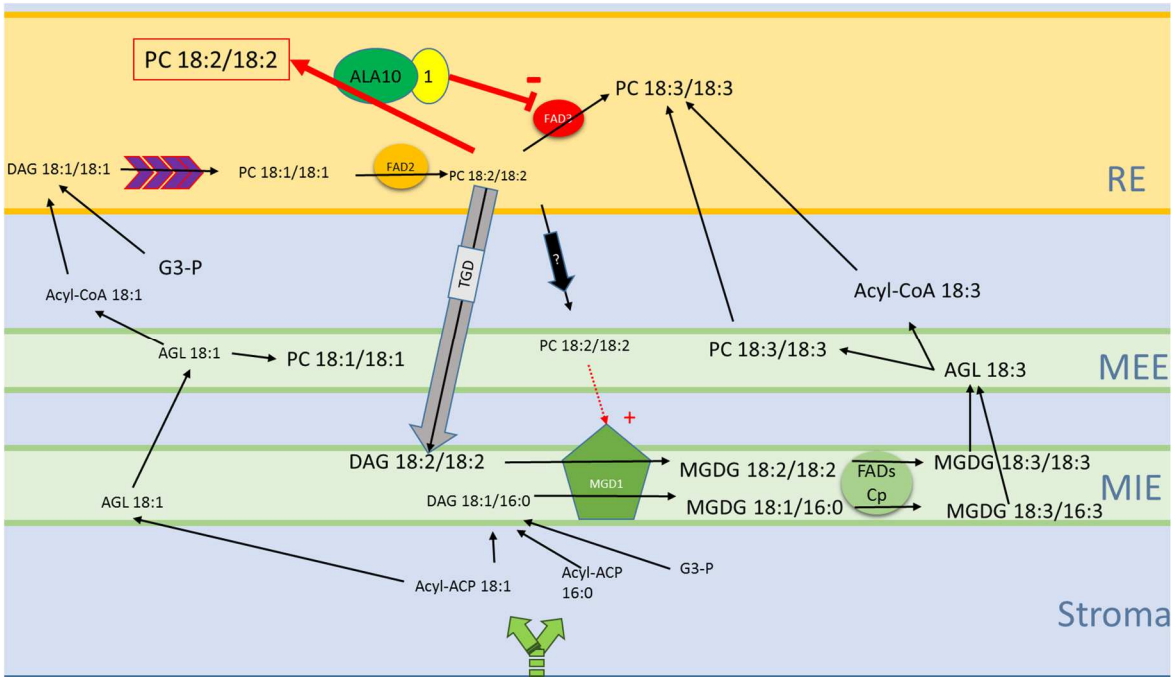


Figure 91 : Schéma de l'homéostasie lipidique entre MGDG et PC dans les cellules non photosynthétiques, ALA10 présente et en association avec ALIS1. *Dans les cellules non photosynthétiques, la néosynthèse d'acide gras est relativement faible, et ALA10 dans ces cellules a un fort impact sur la désaturation de la PC. Cela pourrait être dû au fait qu'ALA10 en interagissant avec FAD2 dévie une partie de la PC 18:2 de FAD ce qui inhibe cette dernière (flèche plate rouge). S'en suit une accumulation de PC 18:2 dans les membranes non photosynthétiques, qui n'est pas compensé par l'acyl-éditing avec les lipides des plastes car ceux ci produisent peu de MGDG dans ces cellules. Les flèches noires représentent les transferts de lipides, la flèche discontinue rouge marquée d'un + représente une activation, la flèche plate marquée d'un – représente une inhibition. Légende des symboles donnée ci-après, commentaire donné dans le texte.*

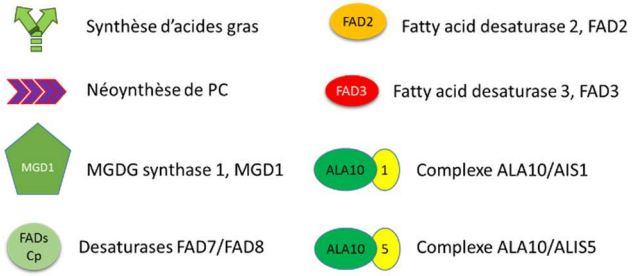


Figure 92 Légende du modèle.

3. Perspectives

Pour confirmer ce modèle et *a minima* pour pouvoir publier ces travaux, il est absolument nécessaire de: 1) quantifier l'expression d'ALA10, des ALIS, de PUB11 et de FT dans toutes les lignées cultivées dans les deux conditions de culture et pendant la journée et pendant la nuit; 2) localiser l'expression d'ALA10, des ALIS et de PUB11 dans les différents tissus végétaux ; 3) reproduire les analyses de lipides effectuées et les étendre aux lignées L2ALIS1 et L2ALIS5; 4) reproduire les observations de microscopie confocale sur différents tissus (épiderme, cellules compagnon du phloème) afin de s'assurer de la localisation différentielle en fonction du tissu; 5) reproduire les observations de microscopie électronique et les étendre aux lignée KO pour les ALIS; 6) Confirmer l'ubiquitination d'ALA10 par PUB11 en reproduisant les expérience d'immunoprécipitation sur la lignée KOpub11/ALA10-GFP, et analyser l'ubiquitination par spectrométrie de masse.

Par ailleurs, l'analyse de la localisation d'ALA10-GFP dans le mutant PUB11 ainsi qu'en carence de phosphate dans la lignée surexpresseur L2 pourrait former, avec l'étude de la régulation post-traductionnelle d'ALA10, un projet de recherche très intéressant. Enfin, si les résultats des analyses de lipides et les phénotypes d'ultrastructure des chloroplastes se confirment, il serait passionnant de mesurer l'impact de la désaturation de la PC sur la synthèse de MGDG des chloroplastes, ce qui pourrait être fait en mettant en présence des chloroplastes purifiés avec des liposomes de PC ayant différentes teneurs en 18:1, 18:2 et 18:3.

Références bibliographique:

AhYoung, A.P., Jiang, J., Zhang, J., Khoi Dang, X., Loo, J.A., Zhou, Z.H., and Egea, P.F. (2015). Conserved SMP domains of the ERMES complex bind phospholipids and mediate tether assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *112*, E3179-3188.

Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T., and Holthuis, J.C. (2006). Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. Molecular biology of the cell *17*, 1632-1642.

Allen, D.K., Bates, P.D., and Tjellstrom, H. (2015). Tracking the metabolic pulse of plant lipid production with isotopic labeling and flux analyses: Past, present and future. Progress in lipid research *58*, 97-120.

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R*., et al.* (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana . Science (New York, N.Y.) *301*, 653-657.

Amara, S., Barouh, N., Lecomte, J., Lafont, D., Robert, S., Villeneuve, P., De Caro, A., and Carrière, F. (2010). Lipolysis of natural long chain and synthetic medium chain galactolipids by pancreatic lipase-related protein 2. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids *1801*, 508-516.

Andersen, J.P., Vestergaard, A.L., Mikkelsen, S.A., Mogensen, L.S., Chalat, M., and Molday, R.S. (2016). P4-ATPases as Phospholipid Flippases-Structure, Function, and Enigmas. Frontiers in physiology *7*, 275.

Andersson, M.X., Goksor, M., and Sandelius, A.S. (2007a). Membrane contact sites: physical attachment between chloroplasts and endoplasmic reticulum revealed by optical manipulation. Plant signaling & behavior *2*, 185-187.

Andersson, M.X., Goksor, M., and Sandelius, A.S. (2007b). Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. The Journal of biological chemistry *282*, 1170-1174.

Andersson, M.X., and Sandelius, A.S. (2004). A chloroplast-localized vesicular transport system: a bio-informatics approach. BMC genomics *5*, 40.

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

Aravind, L., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (1998). The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. Trends Biochem Sci *23*, 127-129.

Arondel, V., Lemieux, B., Hwang, I., Gibson, S., Goodman, H.M., and Somerville, C.R. (1992). Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis. Science (New York, N.Y.) *258*, 1353-1355.

Awai, K., Marechal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., and Joyard, J. (2001). Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 10960-10965.

Azarian, S.M., and Travis, G.H. (1997). The photoreceptor rim protein is an ABC transporter encoded by the gene for recessive Stargardt's disease (ABCR). FEBS letters *409*, 247-252.

Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amiour, N., Parcy, F., Pastuglia, M., and Bouchez, D. (2008). Arabidopsis TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. The Plant cell *20*, 2146-2159.

Azouaoui, H., Montigny, C., Ash, M.R., Fijalkowski, F., Jacquot, A., Gronberg, C., Lopez-Marques, R.L., Palmgren, M.G., Garrigos, M., le Maire, M*., et al.* (2014). A high-yield co-expression system for the purification of an intact Drs2p-Cdc50p lipid flippase complex, critically dependent on and stabilized by phosphatidylinositol-4-phosphate. PloS one *9*, e112176.

Baldridge, R.D., and Graham, T.R. (2012). Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, E290-298.

Baldridge, R.D., and Graham, T.R. (2013). Two-gate mechanism for phospholipid selection and transport by type IV P-type ATPases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, E358-367.

Barbosa, S., Pratte, D., Schwarz, H., Pipkorn, R., and Singer-Kruger, B. (2010). Oligomeric Dop1p is part of the endosomal Neo1p-Ysl2p-Arl1p membrane remodeling complex. Traffic *11*, 1092-1106.

Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R., and Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. BioTechniques *14*, 920-924.

Barton, K.A., Schattat, M.H., Jakob, T., Hause, G., Wilhelm, C., McKenna, J.F., Mathe, C., Runions, J., Van Damme, D., and Mathur, J. (2016). Epidermal Pavement Cells of Arabidopsis Have Chloroplasts. Plant physiology *171*, 723-726.

Bastien, O., Botella, C., Chevalier, F., Block, M.A., Jouhet, J., Breton, C., Girard-Egrot, A., and Marechal, E. (2016). New Insights on Thylakoid Biogenesis in Plant Cells. International review of cell and molecular biology *323*, 1-30.

Bates, P.D. (2016). Understanding the control of acyl flux through the lipid metabolic network of plant oil biosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids *1861*, 1214-1225.

Bates, P.D., Durrett, T.P., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M. (2009). Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos. Plant physiology *150*, 55-72.

Bates, P.D., Fatihi, A., Snapp, A.R., Carlsson, A.S., Browse, J., and Lu, C. (2012). Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols. Plant physiology *160*, 1530-1539.

Bates, P.D., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M. (2007). Incorporation of newly synthesized fatty acids into cytosolic glycerolipids in pea leaves occurs via acyl editing. The Journal of biological chemistry *282*, 31206-31216.

Beisson, F., Koo, A.J., Ruuska, S., Schwender, J., Pollard, M., Thelen, J.J., Paddock, T., Salas, J.J., Savage, L., Milcamps, A*., et al.* (2003). Arabidopsis genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. Plant physiology *132*, 681-697.

Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., and Ohlrogge, J.B. (2007). The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. The Plant cell *19*, 351-368.

Bezhani, S., Winter, C., Hershman, S., Wagner, J.D., Kennedy, J.F., Kwon, C.S., Pfluger, J., Su, Y., and Wagner, D. (2007). Unique, shared, and redundant roles for the Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED. The Plant cell *19*, 403-416.

Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., and Douce, R. (1983). Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. The Journal of biological chemistry *258*, 13281-13286.

Blostein, R., Wilczynska, A., Karlish, S.J., Arguello, J.M., and Lingrel, J.B. (1997). Evidence that Ser775 in the alpha subunit of the Na,K-ATPase is a residue in the cation binding pocket. The Journal of biological chemistry *272*, 24987-24993.

Bolognese, C.P., and McGraw, P. (2000). The isolation and characterization in yeast of a gene for Arabidopsis S-adenosylmethionine:phospho-ethanolamine N-methyltransferase. Plant physiology *124*, 1800-1813.

Bonaventure, G., Salas, J.J., Pollard, M.R., and Ohlrogge, J.B. (2003). Disruption of the FATB gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. The Plant cell *15*, 1020-1033.

Borner, G.H., Sherrier, D.J., Weimar, T., Michaelson, L.V., Hawkins, N.D., Macaskill, A., Napier, J.A., Beale, M.H., Lilley, K.S., and Dupree, P. (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. Plant physiology *137*, 104-116.

Botella, C., Sautron, E., Boudiere, L., Michaud, M., Dubots, E., and Yamaryo-Botte, Y. (2016). ALA10, a Phospholipid Flippase, Controls FAD2/FAD3 Desaturation of Phosphatidylcholine in the ER and Affects Chloroplast Lipid Composition in Arabidopsis thaliana. *170*, 1300-1314.

Botte, C.Y., Deligny, M., Roccia, A., Bonneau, A.L., Saidani, N., Hardre, H., Aci, S., Yamaryo-Botte, Y., Jouhet, J., Dubots, E.*, et al.* (2011). Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in Arabidopsis thaliana. Nature chemical biology *7*, 834-842.

Boudiere, L., Botte, C.Y., Saidani, N., Lajoie, M., Marion, J., Brehelin, L., Yamaryo-Botte, Y., Satiat-Jeunemaitre, B., Breton, C., Girard-Egrot, A.*, et al.* (2012). Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. Molecular bioSystems *8*, 2023-2035, 2014.

Boudiere, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rebeille, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J.*, et al.* (2014). Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. Biochimica et biophysica acta *1837*, 470-480.

Bretscher, M.S. (1972). Phosphatidyl-ethanolamine: differential labelling in intact cells and cell ghosts of human erythrocytes by a membrane-impermeable reagent. Journal of molecular biology *71*, 523-528.

Bretscher, M.S. (1973). Membrane structure: some general principles. Science (New York, N.Y.) *181*, 622-629.

Brindley, D.N., and Waggoner, D.W. (1998). Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. The Journal of biological chemistry *273*, 24281-24284.

Broadwater, J.A., Whittle, E., and Shanklin, J. (2002). Desaturation and hydroxylation. Residues 148 and 324 of Arabidopsis FAD2, in addition to substrate chain length, exert a major influence in partitioning of catalytic specificity. The Journal of biological chemistry *277*, 15613-15620.

Broun, P., Shanklin, J., Whittle, E., and Somerville, C. (1998). Catalytic plasticity of fatty acid modification enzymes underlying chemical diversity of plant lipids. Science (New York, N.Y.) *282*, 1315-1317.

Browse, J., Roughan, P.G., and Slack, C.R. (1981). Light control of fatty acid synthesis and diurnal fluctuations of fatty acid composition in leaves. The Biochemical journal *196*, 347-354.

Brunner, J.D., Lim, N.K., Schenck, S., Duerst, A., and Dutzler, R. (2014). X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. Nature *516*, 207-212.

Bryde, S., Hennrich, H., Verhulst, P.M., Devaux, P.F., Lenoir, G., and Holthuis, J.C. (2010). CDC50 proteins are critical components of the human class-1 P4-ATPase transport machinery. The Journal of biological chemistry *285*, 40562-40572.

Buton, X., Morrot, G., Fellmann, P., and Seigneuret, M. (1996). Ultrafast glycerophospholipid-selective transbilayer motion mediated by a protein in the endoplasmic reticulum membrane. The Journal of biological chemistry *271*, 6651-6657.

Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., and Galietta, L.J.V. (2008). TMEM16A, A Membrane Protein Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity. Science (New York, N.Y.) *322*, 590-594.

Carman, G.M., and Henry, S.A. (2007). Special issue: Regulation of lipid metabolism in yeast. Biochimica et biophysica acta *1771*, 239-240.

Chapman, K.D., and Trelease, R.N. (1991). Acquisition of membrane lipids by differentiating glyoxysomes: role of lipid bodies. The Journal of Cell Biology *115*, 995-1007.

Chen, C.Y., Ingram, M.F., Rosal, P.H., and Graham, T.R. (1999). Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. J Cell Biol *147*, 1223-1236.

Chen, R., Brady, E., and McIntyre, T.M. (2011). Human TMEM30a promotes uptake of antitumor and bioactive choline phospholipids into mammalian cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *186*, 3215-3225.

Chen, S., Wang, J., Muthusamy, B.P., Liu, K., Zare, S., Andersen, R.J., and Graham, T.R. (2006). Roles for the Drs2p-Cdc50p complex in protein transport and phosphatidylserine asymmetry of the yeast plasma membrane. Traffic *7*, 1503-1517.

Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czapla, H., Tanner, L.B., Narayanaswamy, P., Wenk, M.R., Nakatsu, F., and De Camilli, P. (2015). INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. Science (New York, N.Y.) *349*, 428-432.

Coleman, J.A., and Molday, R.S. (2011). Critical role of the beta-subunit CDC50A in the stable expression, assembly, subcellular localization, and lipid transport activity of the P4-ATPase ATP8A2. The Journal of biological chemistry *286*, 17205-17216.

Coleman, J.A., Quazi, F., and Molday, R.S. (2013). Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. Biochimica et biophysica acta *1831*, 555-574.

Coleman, J.A., Vestergaard, A.L., Molday, R.S., Vilsen, B., and Andersen, J.P. (2012). Critical role of a transmembrane lysine in aminophospholipid transport by mammalian photoreceptor P4-ATPase ATP8A2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 1449-1454.

Colland, F., and Daviet, L. (2004). Integrating a functional proteomic approach into the target discovery process. Biochimie *86*, 625-632.

Corradi, G.R., Czysezon, N.A., Mazzitelli, L.R., Sarbia, N., and Adamo, H.P. (2016). Inhibition of the Formation of the Spf1p Phosphoenzyme by Ca2. The Journal of biological chemistry *291*, 7767-7773.

Costa, S.R., Marek, M., Axelsen, K.B., Theorin, L., Pomorski, T.G., and Lopez-Marques, R.L. (2016). Role of post-translational modifications at the beta-subunit ectodomain in complex association with a promiscuous plant P4-ATPase. The Biochemical journal *473*, 1605-1615.

Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., and Stymne, S. (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 6487-6492.

Daleke, D.L. (2007). Phospholipid flippases. The Journal of biological chemistry *282*, 821-825.

Daleke, D.L., and Huestis, W.H. (1989). Erythrocyte morphology reflects the transbilayer distribution of incorporated phospholipids. J Cell Biol *108*, 1375-1385.

Darland-Ransom, M., Wang, X., Sun, C.L., Mapes, J., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., and Xue, D. (2008). Role of C. elegans TAT-1 protein in maintaining plasma membrane phosphatidylserine asymmetry. Science (New York, N.Y.) *320*, 528-531.

Das, A., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Bradford, W.D., Alexander, R., Rubinstein, B., and Li, R. (2012). Flippase-Mediated Phospholipid Asymmetry Promotes Fast Cdc42 Recycling in Dynamic Maintenance of Cell Polarity. Nature cell biology *14*, 304-310.

Deme, B., Cataye, C., Block, M.A., Marechal, E., and Jouhet, J. (2014). Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *28*, 3373-3383.

Devaux, P.F., Herrmann, A., Ohlwein, N., and Kozlov, M.M. (2008). How lipid flippases can modulate membrane structure. Biochimica et biophysica acta *1778*, 1591-1600.

Devaux, P.F., and Morris, R. (2004). Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. Traffic *5*, 241-246.

Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. Nature reviews. Molecular cell biology *10*, 659-671.

Ding, J., Wu, Z., Crider, B.P., Ma, Y., Li, X., Slaughter, C., Gong, L., and Xie, X.S. (2000). Identification and functional expression of four isoforms of ATPase II, the putative aminophospholipid translocase. Effect of isoform variation on the ATPase activity and phospholipid specificity. The Journal of biological chemistry *275*, 23378-23386.

Donaldson, R.P., and Beevers, H. (1977). Lipid composition of organelles from germinating castor bean endosperm. Plant physiology *59*, 259-263.

Dormann, P., Balbo, I., and Benning, C. (1999). Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. Science (New York, N.Y.) *284*, 2181-2184.

Dormann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I., and Benning, C. (1995). Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. The Plant cell *7*, 1801-1810.

Dorne, A.J., Joyard, J., Block, M.A., and Douce, R. (1985). Localization of phosphatidylcholine in outer envelope membrane of spinach chloroplasts. J Cell Biol *100*, 1690-1697.

Dorne, A.J., Joyard, J., and Douce, R. (1990). Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *87*, 71-74.

Dubots, E., Audry, M., Yamaryo, Y., Bastien, O., Ohta, H., Breton, C., Marechal, E., and Block, M.A. (2010). Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. The Journal of biological chemistry *285*, 6003-6011.

Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. The Plant journal : for cell and molecular biology *45*, 616-629.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. Journal of molecular biology *300*, 1005-1016.

Ezanno, P., Cribier, S., and Devaux, P.F. (2010). Asymmetrical stress generated by the erythrocyte lipid flippase triggers multiple bud formation on the surface of spherical giant liposomes. European biophysics journal : EBJ *39*, 1277-1280.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L., and Henson, P.M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. Cell death and differentiation *5*, 551-562.

Fan, J.-Y., Cui, Z.-Q., Wei, H.-P., Zhang, Z.-P., Zhou, Y.-F., Wang, Y.-P., and Zhang, X.-E. (2008). Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein–protein interactions in living cells. Biochemical and biophysical research communications *367*, 47-53.

Farge, E., Ojcius, D.M., Subtil, A., and Dautry-Varsat, A. (1999). Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. The American journal of physiology *276*, C725-733.

Ferrell, J.E., Jr., Lee, K.J., and Huestis, W.H. (1985). Lipid transfer between phosphatidylcholine vesicles and human erythrocytes: exponential decrease in rate with increasing acyl chain length. Biochemistry *24*, 2857-2864.

Ferro, M., Salvi, D., Brugiere, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J., and Rolland, N. (2003). Proteomics of the chloroplast envelope membranes from Arabidopsis thaliana. Molecular & cellular proteomics : MCP *2*, 325-345.

Ferro, M., Salvi, D., Riviere-Rolland, H., Vermat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., and Rolland, N. (2002). Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 11487-11492.

Franzini-Armstrong, C. (1964). FINE STRUCTURE OF SARCOPLASMIC RETICULUM AND TRANVERSE TUBULAR SYSTEM IN MUSCLE FIBERS. Federation proceedings *23*, 887-895.

Frentzen, M., and Griebau, R. (1994). Biosynthesis of Cardiolipin in Plant Mitochondria. Plant physiology *106*, 1527-1532.

Frentzen, M., Neuburger, M., Joyard, J., and Douce, R. (1990). Intraorganelle localization and substrate specificities of the mitochondrial acyl-CoA: sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase and acyl-CoA: 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase from potato tubers and pea leaves. European journal of biochemistry / FEBS *187*, 395-402.

Froehlich, J.E., Benning, C., and Dormann, P. (2001). The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. The Journal of biological chemistry *276*, 31806-31812.

Fromont-Racine, M., Rain, J.C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. Nature genetics *16*, 277-282.

Frost, A., Unger, V.M., and De Camilli, P. (2009). The BAR Domain Superfamily: Membrane-Molding Macromolecules. Cell *137*, 191-196.

Furt, F., Konig, S., Bessoule, J.J., Sargueil, F., Zallot, R., Stanislas, T., Noirot, E., Lherminier, J., Simon-Plas, F., Heilmann, I.*, et al.* (2010). Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. Plant physiology *152*, 2173-2187.

Furt, F., Lefebvre, B., Cullimore, J., Bessoule, J.J., and Mongrand, S. (2007). Plant lipid rafts: fluctuat nec mergitur. Plant signaling & behavior *2*, 508-511.

Furuta, N., Fujimura-Kamada, K., Saito, K., Yamamoto, T., and Tanaka, K. (2007). Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway. Molecular biology of the cell *18*, 295-312.

Gall, W.E., Geething, N.C., Hua, Z., Ingram, M.F., Liu, K., Chen, S.I., and Graham, T.R. (2002). Drs2p-Dependent Formation of Exocytic Clathrin-Coated Vesicles In Vivo. Current Biology *12*, 1623-1627.

Gomès, E., Jakobsen, M.K., Axelsen, K.B., Geisler, M., and Palmgren, M.G. (2000). Chilling Tolerance in Arabidopsis Involves ALA1, a Member of a New Family of Putative Aminophospholipid Translocases. The Plant cell *12*, 2441-2453.

Goren, M.A., Morizumi, T., Menon, I., Joseph, J.S., Dittman, J.S., Cherezov, V., Stevens, R.C., Ernst, O.P., and Menon, A.K. (2014). Constitutive phospholipid scramblase activity of a G protein-coupled receptor. Nature communications *5*, 5115.

Gounaris, K., Barber, J., and Harwood, J.L. (1986). The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. The Biochemical journal *237*, 313-326.

Graham, T.R., and Kozlov, M.M. (2010). Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. Current opinion in cell biology *22*, 430-436.

Guillot-Salomon, T., Rémy, R., Cantrel, C., Demandre, C., and Moreau, F. (1997). Phospholipids and polypeptides in the outer membrane of maize mitochondria. Phytochemistry *44*, 29-34.

Han, G.S., Wu, W.I., and Carman, G.M. (2006). The Saccharomyces cerevisiae Lipin homolog is a Mg2+-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. The Journal of biological chemistry *281*, 9210-9218.

Haney, C.H., Riely, B.K., Tricoli, D.M., Cook, D.R., Ehrhardt, D.W., and Long, S.R. (2011). Symbiotic rhizobia bacteria trigger a change in localization and dynamics of the Medicago truncatula receptor kinase LYK3. The Plant cell *23*, 2774-2787.

Hartmann, M.-A., and Benveniste, P. (1987). [58] Plant membrane sterols: Isolation, identification, and biosynthesis. In Methods in Enzymology (Academic Press), pp. 632-650.

Harwood, H.J., Jr. (2005). Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. Expert opinion on therapeutic targets *9*, 267-281.

Harwood, J.L. (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. Biochimica et biophysica acta *1301*, 7-56.

Hawes, C., and Satiat-Jeunemaitre, B. (2005). The plant Golgi apparatus--going with the flow. Biochimica et biophysica acta *1744*, 466-480.

Helenius, J., Ng, D.T., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A., and Aebi, M. (2002). Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. Nature *415*, 447-450.

Hodge, A.J., McLean, J.D., and Mercer, F.V. (1955). ULTRASTRUCTURE OF THE LAMELLAE AND GRANA IN THE CHLOROPLASTS OF ZEA MAYS L. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology *1*, 605-614.

Holthuis, J.C., and Levine, T.P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. Nature reviews. Molecular cell biology *6*, 209-220.

Holzl, G., Witt, S., Gaude, N., Melzer, M., Schottler, M.A., and Dormann, P. (2009). The role of diglycosyl lipids in photosynthesis and membrane lipid homeostasis in Arabidopsis. Plant physiology *150*, 1147-1159.

Hong, Y., Zhang, W., and Wang, X. (2010). Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. Plant, Cell & Environment *33*, 627-635.

Hua, Z., and Graham, T.R. (2003). Requirement for Neo1p in Retrograde Transport from the Golgi Complex to the Endoplasmic Reticulum. Molecular biology of the cell *14*, 4971-4983.

Hurlock, A.K., Roston, R.L., Wang, K., and Benning, C. (2014). Lipid Trafficking in Plant Cells. Traffic *15*, 915-932.

Iba, K., Gibson, S., Nishiuchi, T., Fuse, T., Nishimura, M., Arondel, V., Hugly, S., and Somerville, C. (1993). A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the fad7 mutant of Arabidopsis thaliana. The Journal of biological chemistry *268*, 24099-24105.

Inatsugi, R., Kawai, H., Yamaoka, Y., Yu, Y., Sekiguchi, A., Nakamura, M., and Nishida, I. (2009). Isozyme-specific modes of activation of CTP:phosphorylcholine cytidylyltransferase in Arabidopsis thaliana at low temperature. Plant & cell physiology *50*, 1727-1735.

Inatsugi, R., Nakamura, M., and Nishida, I. (2002). Phosphatidylcholine biosynthesis at low temperature: differential expression of CTP:phosphorylcholine cytidylyltransferase isogenes in Arabidopsis thaliana. Plant & cell physiology *43*, 1342-1350.

Itoh, T., and De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. Biochimica et biophysica acta *1761*, 897-912.

Jacquot, A., Montigny, C., Hennrich, H., Barry, R., le Maire, M., Jaxel, C., Holthuis, J., Champeil, P., and Lenoir, G. (2012). Phosphatidylserine stimulation of Drs2p.Cdc50p lipid translocase dephosphorylation is controlled by phosphatidylinositol-4-phosphate. The Journal of biological chemistry *287*, 13249-13261.

Jarvis, P., Dormann, P., Peto, C.A., Lutes, J., Benning, C., and Chory, J. (2000). Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 8175-8179.

Jensen, M.S., Costa, S.R., Theorin, L., Christensen, J.P., Pomorski, T.G., and Lopez-Marques, R.L. (2016). Application of image cytometry to characterize heterologous lipid flippases in yeast. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology *89*, 673-680.

Jessen, D., Roth, C., Wiermer, M., and Fulda, M. (2015). Two activities of long-chain acyl-coenzyme A synthetase are involved in lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in Arabidopsis. Plant physiology *167*, 351-366.

Jones, D.T., Taylor, W.R., and Thornton, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer applications in the biosciences : CABIOS *8*, 275-282.

Jouhet, J. (2013). Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. Frontiers in plant science *4*, 494.

Joyard, J., Block, M., Pineau, B., Albrieux, C., and Douce, R. (1990). Envelope membranes from mature spinach chloroplasts contain a NADPH:protochlorophyllide reductase on the cytosolic side of the outer membrane. The Journal of biological chemistry *265*, 21820-21827.

Joyard, J., and Douce, R. (1977). Site of synthesis of phosphatidic acid and diacyglycerol in spinach chloroplasts. Biochimica et biophysica acta *486*, 273-285.

Joyard, J., and Douce, R. (1979). Characterization of phosphatidate phosphohydrolase activity associated with chloroplast envelope membranes. FEBS letters *102*, 147-150.

Jung, C., Zhao, P., Seo, J.S., Mitsuda, N., and Deng, S. (2015). PLANT U-BOX PROTEIN10 Regulates MYC2 Stability in Arabidopsis. *27*, 2016-2031.

Jurgens, G. (2004). Membrane trafficking in plants. Annual review of cell and developmental biology *20*, 481-504.

Katagiri, T., Ishiyama, K., Kato, T., Tabata, S., Kobayashi, M., and Shinozaki, K. (2005). An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in Arabidopsis thaliana. The Plant journal : for cell and molecular biology *43*, 107-117.

Kellosalo, J., Kajander, T., Palmgren, M.G., Lopez-Marques, R.L., and Goldman, A. (2011). Heterologous expression and purification of membrane-bound pyrophosphatases. Protein expression and purification *79*, 25-34.

Kelly, A.A., Froehlich, J.E., and Dormann, P. (2003). Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in Arabidopsis reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. The Plant cell *15*, 2694-2706.

Keogh, M.R., Courtney, P.D., Kinney, A.J., and Dewey, R.E. (2009). Functional characterization of phospholipid N-methyltransferases from Arabidopsis and soybean. The Journal of biological chemistry *284*, 15439-15447.

Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E.B., Nishida, I., and Lee, Y. (2013). AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 773-778.

Klaus, D., Hartel, H., Fitzpatrick, L.M., Froehlich, J.E., Hubert, J., Benning, C., and Dormann, P. (2002). Digalactosyldiacylglycerol synthesis in chloroplasts of the Arabidopsis dgd1 mutant. Plant physiology *128*, 885-895.

Knowles, J.R. (1989). The mechanism of biotin-dependent enzymes. Annual review of biochemistry *58*, 195-221.

Kobayashi, K., Awai, K., Nakamura, M., Nagatani, A., Masuda, T., and Ohta, H. (2009). Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. The Plant journal : for cell and molecular biology *57*, 322-331.

Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., and Ohta, H. (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 17216-17221.

Kodama, Y., and Hu, C.D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. BioTechniques *53*, 285-298.

Koivuniemi, A., Vuorela, T., Kovanen, P.T., Vattulainen, I., and Hyvönen, M.T. (2012). Lipid Exchange Mechanism of the Cholesteryl Ester Transfer Protein Clarified by Atomistic and Coarse-grained Simulations. PLoS Comput Biol *8*, e1002299.

Kol, M.A., van Laak, A.N., Rijkers, D.T., Killian, J.A., de Kroon, A.I., and de Kruijff, B. (2003). Phospholipid flop induced by transmembrane peptides in model membranes is modulated by lipid composition. Biochemistry *42*, 231-237.

Koo, A.J., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M. (2004). On the export of fatty acids from the chloroplast. The Journal of biological chemistry *279*, 16101-16110.

Kopec, K.O., Alva, V., and Lupas, A.N. (2010). Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria. Bioinformatics *26*, 1927-1931.

Kopka, J., Ludewig, M., and Muller-Rober, B. (1997). Complementary DNAs encoding eukaryotic-type cytidine-5'-diphosphate-diacylglycerol synthases of two plant species. Plant physiology *113*, 997-1002.

Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. Science (New York, N.Y.) *325*, 477-481.

Kotzer, A.M., Brandizzi, F., Neumann, U., Paris, N., Moore, I., and Hawes, C. (2004). AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. J Cell Sci *117*, 6377-6389.

Kozjak-Pavlovic, V. (2016). The MICOS complex of human mitochondria. Cell and tissue research.

Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U.C., Soll, J., and Westhoff, P. (2001). VIPP1, a nuclear gene of Arabidopsis thaliana essential for thylakoid membrane formation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 4238-4242.

Lager, I., Glab, B., Eriksson, L., Chen, G., Banas, A., and Stymne, S. (2015). Novel reactions in acyl editing of phosphatidylcholine by lysophosphatidylcholine transacylase (LPCT) and acyl-CoA:glycerophosphocholine acyltransferase (GPCAT) activities in microsomal preparations of plant tissues. Planta *241*, 347-358.

Laloi, M., Perret, A.M., Chatre, L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultier, M.N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J.M., Vallet, M.*, et al.* (2007). Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. Plant physiology *143*, 461-472.

Lands, W.E. (1965). LIPID METABOLISM. Annual review of biochemistry *34*, 313-346.

Lang, A.B., Peter, A.T.J., Walter, P., and Kornmann, B. (2015). ER–mitochondrial junctions can be bypassed by dominant mutations in the endosomal protein Vps13. The Journal of Cell Biology *210*, 883-890.

Lee, S.D., Wasan, K.M., Calcagni, A., Avery, M., McCush, F., and Chen, C. (2006). The in vitro plasma distribution of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, torcetrapib, is influenced by differences in plasma lipid concentrations. Pharmaceutical research *23*, 1025-1030.

Lee, T.-S., Lee, J.-Y., Kyung, J.W., Yang, Y., Park, S.J., Lee, S., Pavlovic, I., Kong, B., Jho, Y.S., Jessen, H.J.*, et al.* (2016). Inositol pyrophosphates inhibit synaptotagmin-dependent exocytosis. Proceedings of the National Academy of Sciences *113*, 8314-8319.

Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M.A., Michaelson, L.V., Carde, J.P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J.A., Cullimore, J., Bessoule, J.J.*, et al.* (2007). Characterization of lipid rafts from Medicago truncatula root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. Plant physiology *144*, 402-418.

Lenoir, G., Williamson, P., Puts, C.F., and Holthuis, J.C. (2009). Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p. The Journal of biological chemistry *284*, 17956-17967.

Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. Nature reviews. Molecular cell biology *11*, 739-750.

Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., Durrett, T.P.*, et al.* (2013). Acyl-Lipid Metabolism. The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists *11*, e0161.

Li, C., Wang, Y., Liu, L., Hu, Y., Zhang, F., Mergen, S., Wang, G., Schläppi, M.R., and Chu, C. (2011). A Rice Plastidial Nucleotide Sugar Epimerase Is Involved in Galactolipid Biosynthesis and Improves Photosynthetic Efficiency. PLoS Genetics *7*, e1002196.

Li, N., Gugel, I.L., Giavalisco, P., Zeisler, V., Schreiber, L., Soll, J., and Philippar, K. (2015). FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export. PLoS biology *13*, e1002053.

Li, R., Yu, K., and Hildebrand, D.F. (2010). DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. Lipids *45*, 145-157.

Li, Y., Beisson, F., Koo, A.J., Molina, I., Pollard, M., and Ohlrogge, J. (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 18339-18344.

Lin, Y.C., Liu, Y., and Nakamura, Y. (2015). The Choline/Ethanolamine Kinase Family in Arabidopsis: Essential Role of CEK4 in Phospholipid Biosynthesis and Embryo Development. The Plant cell *27*, 1497-1511.

Liu, P., Li, R.L., Zhang, L., Wang, Q.L., Niehaus, K., Baluska, F., Samaj, J., and Lin, J.X. (2009). Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in Picea meyeri pollen tube tip growth. The Plant journal : for cell and molecular biology *60*, 303-313.

Liu, Y., Wang, G., and Wang, X. (2015). Role of aminoalcoholphosphotransferases 1 and 2 in phospholipid homeostasis in Arabidopsis. *27*, 1512-1528.

Lopez-Marques, R.L., Holthuis, J.C., and Pomorski, T.G. (2011). Pumping lipids with P4-ATPases. Biological chemistry *392*, 67-76.

Lopez-Marques, R.L., Perez-Castineira, J.R., Buch-Pedersen, M.J., Marco, S., Rigaud, J.L., Palmgren, M.G., and Serrano, A. (2005). Large-scale purification of the proton pumping pyrophosphatase from Thermotoga maritima: a "Hot-Solve" method for isolation of recombinant thermophilic membrane proteins. Biochimica et biophysica acta *1716*, 69-76.

Lopez-Marques, R.L., Perez-Castineira, J.R., Losada, M., and Serrano, A. (2004). Differential regulation of soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases in the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum provides insights into pyrophosphate-based stress bioenergetics. Journal of bacteriology *186*, 5418-5426.

Lopez-Marques, R.L., Poulsen, L.R., Bailly, A., Geisler, M., Pomorski, T.G., and Palmgren, M.G. (2015). Structure and mechanism of ATP-dependent phospholipid transporters. Biochimica et biophysica acta *1850*, 461-475.

Lopez-Marques, R.L., Poulsen, L.R., Hanisch, S., Meffert, K., Buch-Pedersen, M.J., Jakobsen, M.K., Pomorski, T.G., and Palmgren, M.G. (2010). Intracellular targeting signals and lipid specificity determinants of the ALA/ALIS P4-ATPase complex reside in the catalytic ALA alpha-subunit. Molecular biology of the cell *21*, 791-801.

Lopez-Marques, R.L., Poulsen, L.R., and Palmgren, M.G. (2012). A putative plant aminophospholipid flippase, the Arabidopsis P4 ATPase ALA1, localizes to the plasma membrane following association with a beta-subunit. PloS one *7*, e33042.

Lopez-Marques, R.L., Theorin, L., Palmgren, M.G., and Pomorski, T.G. (2014). P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. Pflugers Archiv : European journal of physiology *466*, 1227-1240.

Lou, Y., Schwender, J., and Shanklin, J. (2014). FAD2 and FAD3 desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling in vivo. The Journal of biological chemistry *289*, 17996-18007.

Malherbe, A., Block, M.A., Joyard, J., and Douce, R. (1992). Feedback inhibition of phosphatidate phosphatase from spinach chloroplast envelope membranes by diacylglycerol. The Journal of biological chemistry *267*, 23546-23553.

Malinsky, J., Opekarova, M., Grossmann, G., and Tanner, W. (2013). Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi. Annual review of plant biology *64*, 501-529.

Malvezzi, M., Chalat, M., Janjusevic, R., Picollo, A., Terashima, H., Menon, A.K., and Accardi, A. (2013). Ca2+-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel. Nature communications *4*, 2367.

Maor, R., Jones, A., Nuhse, T.S., Studholme, D.J., Peck, S.C., and Shirasu, K. (2007). Multidimensional protein identification technology (MudPIT) analysis of ubiquitinated proteins in plants. Molecular & cellular proteomics : MCP *6*, 601-610.

Marechal, E., and Bastien, O. (2014). Modeling of regulatory loops controlling galactolipid biosynthesis in the inner envelope membrane of chloroplasts. Journal of theoretical biology *361*, 1-13.

Maréchal, E., Block, M.A., Dorne, A.J., Douce, R., and Joyard, J. (1997). Lipid synthesis and metabolism in the plastid envelope. Physiologia Plantarum *100*, 65-77.

Marechal, E., Miege, C., Block, M.A., Douce, R., and Joyard, J. (1995). The catalytic site of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. Biochemical analysis of the structure and of the metal content. The Journal of biological chemistry *270*, 5714-5722.

Marx, U., Lassmann, G., Holzhütter, H.-G., Wüstner, D., Müller, P., Höhlig, A., Kubelt, J., and Herrmann, A. (2000). Rapid Flip-Flop of Phospholipids in Endoplasmic Reticulum Membranes Studied by a Stopped-Flow Approach. Biophysical journal *78*, 2628-2640.

Matsumoto, K., Hara, H., Fishov, I., Mileykovskaya, E., and Norris, V. (2015). The membrane: transertion as an organizing principle in membrane heterogeneity. Frontiers in Microbiology *6*, 572.

Maxwell, K., and Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence--a practical guide. Journal of experimental botany *51*, 659-668.

McDowell, S.C., Lopez-Marques, R.L., Cohen, T., Brown, E., Rosenberg, A., Palmgren, M.G., and Harper, J.F. (2015). Loss of the Arabidopsis thaliana P4-ATPases ALA6 and ALA7 impairs pollen fitness and alters the pollen tube plasma membrane. Frontiers in plant science *6*, 197.

McDowell, S.C., Lopez-Marques, R.L., Poulsen, L.R., Palmgren, M.G., and Harper, J.F. (2013). Loss of the Arabidopsis thaliana P(4)-ATPase ALA3 reduces adaptability to temperature stresses and impairs vegetative, pollen, and ovule development. PloS one *8*, e62577.

McMahon, H.T., and Gallop, J.L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. Nature *438*, 590-596.

Mei, C., Michaud, M., Cussac, M., Albrieux, C., Gros, V., Marechal, E., Block, M.A., Jouhet, J., and Rebeille, F. (2015). Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures. Scientific reports *5*, 15207.

Menon, I., Huber, T., Sanyal, S., Banerjee, S., Barré, P., Canis, S., Warren, J.D., Hwa, J., Sakmar, T.P., and Menon, A.K. (2011). Opsin Is a Phospholipid Flippase. Current Biology *21*, 149-153.

Merklinger, E., Schloetel, J.G., Spitta, L., Thiele, C., and Lang, T. (2016). No Evidence for Spontaneous Lipid Transfer at ER-PM Membrane Contact Sites. The Journal of membrane biology *249*, 41-56.

Mesmin, B., and Antonny, B. (2016). The counterflow transport of sterols and PI4P. Biochimica et biophysica acta *1861*, 940-951.

Michaud, M., Prinz, W.A., and Jouhet, J. (2016). Glycerolipid synthesis and lipid trafficking in plant mitochondria. The FEBS journal.

Miege, C., Marechal, E., Shimojima, M., Awai, K., Block, M.A., Ohta, H., Takamiya, K., Douce, R., and Joyard, J. (1999). Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. European journal of biochemistry / FEBS *265*, 990-1001.

Mills, R.F., Doherty, M.L., Lopez-Marques, R.L., Weimar, T., Dupree, P., Palmgren, M.G., Pittman, J.K., and Williams, L.E. (2008). ECA3, a Golgi-localized P2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in Arabidopsis. Plant physiology *146*, 116-128.

Mitra, S.K., Walters, B.T., Clouse, S.D., and Goshe, M.B. (2009). An efficient organic solvent based extraction method for the proteomic analysis of Arabidopsis plasma membranes. Journal of proteome research *8*, 2752-2767.

Mitsuhashi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2000). Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells. Plant & cell physiology *41*, 993-1001.

Mizusawa, N., and Wada, H. (2012). The role of lipids in photosystem II. Biochimica et biophysica acta *1817*, 194-208.

Mlodzinska, E., and Zboinska, M. (2016). Phosphate Uptake and Allocation - A Closer Look at Arabidopsis thaliana L. and Oryza sativa L. Frontiers in plant science *7*, 1198.

Mongrand, S., Cassagne, C., and Bessoule, J.-J. (2000). Import of Lyso-Phosphatidylcholine into Chloroplasts Likely at the Origin of Eukaryotic Plastidial Lipids. Plant physiology *122*, 845-852.

Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.P., Hartmann, M.A., Bonneu, M., Simon-Plas, F., Lessire, R., and Bessoule, J.J. (2004). Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. The Journal of biological chemistry *279*, 36277-36286.

Mongrand, S., Stanislas, T., Bayer, E.M., Lherminier, J., and Simon-Plas, F. (2010). Membrane rafts in plant cells. Trends in plant science *15*, 656-663.

Montigny, C., Lyons, J., Champeil, P., Nissen, P., and Lenoir, G. (2016). On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. Biochimica et biophysica acta *1861*, 767-783.

Moreau, P., Bessoule, J.J., Mongrand, S., Testet, E., Vincent, P., and Cassagne, C. (1998). Lipid trafficking in plant cells. Progress in lipid research *37*, 371-391.

Morell, M., Espargaro, A., Aviles, F.X., and Ventura, S. (2007). Detection of transient protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation: the Abl-SH3 case. Proteomics *7*, 1023-1036.

Morre, D.J., Sellden, G., Sundqvist, C., and Sandelius, A.S. (1991). Stromal low temperature compartment derived from the inner membrane of the chloroplast envelope. Plant physiology *97*, 1558-1564.

Moser von Filseck, J., Čopič, A., Delfosse, V., Vanni, S., Jackson, C.L., Bourguet, W., and Drin, G. (2015). Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. Science (New York, N.Y.) *349*, 432-436.

Mousley, C.J., Tyeryar, K.R., Vincent-Pope, P., and Bankaitis, V.A. (2007). The Sec14-superfamily and the regulatory interface between phospholipid metabolism and membrane trafficking. Biochimica et biophysica acta *1771*, 727-736.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum *15*, 473-497.

Murphy, R.M., Dutka, T.L., Horvath, D., Bell, J.R., Delbridge, L.M., and Lamb, G.D. (2013). Ca(2+)-dependent proteolysis of junctophilin-1 and junctophilin-2 in skeletal and cardiac muscle. The Journal of Physiology *591*, 719-729.

Musgaard, M., Thogersen, L., Schiott, B., and Tajkhorshid, E. (2012). Tracing cytoplasmic Ca(2+) ion and water access points in the Ca(2+)-ATPase. Biophysical journal *102*, 268-277.

Nakamura, Y., Andrés, F., Kanehara, K., Liu, Y.-c., Coupland, G., and Dörmann, P. (2014a). Diurnal and circadian expression profiles of glycerolipid biosynthetic genes in Arabidopsis. Plant signaling & behavior *9*, e29715.

Nakamura, Y., Andrés, F., Kanehara, K., Liu, Y.-c., Dörmann, P., and Coupland, G. (2014b). Arabidopsis florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. Nature communications *5*, 3553.

Nakamura, Y., Tsuchiya, M., and Ohta, H. (2007). Plastidic phosphatidic acid phosphatases identified in a distinct subfamily of lipid phosphate phosphatases with prokaryotic origin. The Journal of biological chemistry *282*, 29013-29021.

Nath, D., and Shadan, S. (2009). The ubiquitin system. Nature *458*, 421-421.

Nebenfuhr, A. (2002). Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, Rabs and SNAREs. Current opinion in plant biology *5*, 507-512.

Nerlich, A., von Orlow, M., Rontein, D., Hanson, A.D., and Dormann, P. (2007). Deficiency in phosphatidylserine decarboxylase activity in the psd1 psd2 psd3 triple mutant of Arabidopsis affects phosphatidylethanolamine accumulation in mitochondria. Plant physiology *144*, 904-914.

O'Brien, I.E., Reutelingsperger, C.P., and Holdaway, K.M. (1997). Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. Cytometry *29*, 28-33.

Oberholzer, T., Nierhaus, K.H., and Luisi, P.L. (1999). Protein expression in liposomes. Biochemical and biophysical research communications *261*, 238-241.

Ohlrogge, J., and Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. The Plant cell *7*, 957-970.

Ohlrogge, J.B., and Jaworski, J.G. (1997). Regulation of Fatty Acid Synthesis. Annual review of plant physiology and plant molecular biology *48*, 109-136.

Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., Lark, E., and Browse, J. (1994). Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. The Plant cell *6*, 147-158.

Olesen, C., Sorensen, T.L., Nielsen, R.C., Moller, J.V., and Nissen, P. (2004). Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. Science (New York, N.Y.) *306*, 2251-2255.

Olkkonen, V.M. (2015). OSBP-Related Protein Family in Lipid Transport Over Membrane Contact Sites. Lipid insights *8*, 1-9.

Onat, O.E., Gulsuner, S., Bilguvar, K., Nazli Basak, A., Topaloglu, H., Tan, M., Tan, U., Gunel, M., and Ozcelik, T. (2013). Missense mutation in the ATPase, aminophospholipid transporter protein ATP8A2 is associated with cerebellar atrophy and quadrupedal locomotion. European journal of human genetics : EJHG *21*, 281-285.

Oxborough, K., and Baker, N.R. (1997). Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv-/Fm-; without measuring Fo. Photosynthesis research *54*, 135-142.

P G Roughan, a., and Slack, C.R. (1982). Cellular Organization of Glycerolipid Metabolism. Annual Review of Plant Physiology *33*, 97-132.

Palmgren, M.G., and Nissen, P. (2011). P-type ATPases. Annual review of biophysics *40*, 243-266.

Papadopoulos, J.S., and Agarwala, R. (2007). COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. Bioinformatics *23*, 1073-1079.

Paulusma, C.C., and Elferink, R.P. (2010). P4 ATPases--the physiological relevance of lipid flipping transporters. FEBS letters *584*, 2708-2716.

Pedemonte, N., and Galietta, L.J. (2014). Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). Physiological reviews *94*, 419-459.

Pedersen, P.L., and Carafoli, E. (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. Trends in Biochemical Sciences *12*, 146-150.

Perez-Castineira, J.R., Gomez-Garcia, R., Lopez-Marques, R.L., Losada, M., and Serrano, A. (2001a). Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones? International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology *4*, 135-142.

Perez-Castineira, J.R., Lopez-Marques, R.L., Losada, M., and Serrano, A. (2001b). A thermostable K(+)-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima. FEBS letters *496*, 6-11.

Perez-Castineira, J.R., Lopez-Marques, R.L., Villalba, J.M., Losada, M., and Serrano, A. (2002). Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H+-translocating pyrophosphatases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 15914-15919.

Perez-Victoria, F.J., Sanchez-Canete, M.P., Castanys, S., and Gamarro, F. (2006). Phospholipid translocation and miltefosine potency require both L. donovani miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in Leishmania parasites. The Journal of biological chemistry *281*, 23766-23775.

Peskan, T., Westermann, M., and Oelmuller, R. (2000). Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. European journal of biochemistry / FEBS *267*, 6989-6995.

Pierrugues, O., Brutesco, C., Oshiro, J., Gouy, M., Deveaux, Y., Carman, G.M., Thuriaux, P., and Kazmaier, M. (2001). Lipid phosphate phosphatases in Arabidopsis. Regulation of the AtLPP1 gene in response to stress. The Journal of biological chemistry *276*, 20300-20308.

Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L.A., Ferreira, T., Gautier, R., Goud, B., Antonny, B., and Barelli, H. (2014). Lipid cell biology. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. Science (New York, N.Y.) *345*, 693-697.

Pollard, M., and Ohlrogge, J. (1999). Testing models of fatty acid transfer and lipid synthesis in spinach leaf using in vivo oxygen-18 labeling. Plant physiology *121*, 1217-1226.

Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P.F., van Meer, G., and Holthuis, J.C. (2003). Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. Molecular biology of the cell *14*, 1240-1254.

Post, R.L., Hegyvary, C., and Kume, S. (1972). Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. The Journal of biological chemistry *247*, 6530-6540.

Poulsen, L.R., Lopez-Marques, R.L., McDowell, S.C., Okkeri, J., Licht, D., Schulz, A., Pomorski, T., Harper, J.F., and Palmgren, M.G. (2008a). The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the golgi and requires a beta-subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. The Plant cell *20*, 658-676.

Poulsen, L.R., Lopez-Marques, R.L., and Palmgren, M.G. (2008b). Flippases: still more questions than answers. Cellular and molecular life sciences : CMLS *65*, 3119-3125.

Poulsen, L.R., Lopez-Marques, R.L., Pedas, P.R., McDowell, S.C., Brown, E., Kunze, R., Harper, J.F., Pomorski, T.G., and Palmgren, M. (2015). A phospholipid uptake system in the model plant Arabidopsis thaliana. Nature communications *6*, 7649.

Poulsen, L.R., Palmgren, M.G., and Lopez-Marques, R.L. (2016). Transient Expression of P-type ATPases in Tobacco Epidermal Cells. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) *1377*, 383-393.

Prinz, W.A. (2010). Lipid trafficking sans vesicles: where, why, how? Cell *143*, 870-874.

Prinz, W.A. (2014). The lipid trade. Nature reviews. Molecular cell biology *15*, 79.

Puts, C.F., and Holthuis, J.C. (2009). Mechanism and significance of P4 ATPase-catalyzed lipid transport: lessons from a Na+/K+-pump. Biochimica et biophysica acta *1791*, 603-611.

Quon, E., and Beh, C.T. (2015). Membrane Contact Sites: Complex Zones for Membrane Association and Lipid Exchange. Lipid insights *8*, 55-63.

Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., German Retana, S., Boubekeur, T., Leborgne-Castel, N., Carde, J.P., Lherminier, J., Noirot, E*., et al.* (2009a). Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. The Plant cell *21*, 1541-1555.

Raffaele, S., Bayer, E., and Mongrand, S. (2009b). Upregulation of the plant protein remorin correlates with dehiscence and cell maturation: a link with the maturation of plasmodesmata? Plant signaling & behavior *4*, 915-919.

Raiborg, C., Wenzel, E.M., Pedersen, N.M., and Stenmark, H. (2016). Phosphoinositides in membrane contact sites. Biochemical Society transactions *44*, 425-430.

Rajasekharan, A., and Gummadi, S.N. (2012). Inhibition of biogenic membrane flippase activity in reconstituted ER proteoliposomes in the presence of low cholesterol levels. Cellular & molecular biology letters *17*, 136-152.

Reese, C., and Mayer, A. (2005). Transition from hemifusion to pore opening is rate limiting for vacuole membrane fusion. The Journal of Cell Biology *171*, 981-990.

Reynwar, B.J., Illya, G., Harmandaris, V.A., Muller, M.M., Kremer, K., and Deserno, M. (2007). Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. Nature *447*, 461-464.

Riekhof, W.R., and Voelker, D.R. (2006). Uptake and utilization of lyso-phosphatidylethanolamine by Saccharomyces cerevisiae. The Journal of biological chemistry *281*, 36588-36596.

Riekhof, W.R., Wu, J., Jones, J.L., and Voelker, D.R. (2007). Identification and characterization of the major lysophosphatidylethanolamine acyltransferase in Saccharomyces cerevisiae. The Journal of biological chemistry *282*, 28344-28352.

Rinaldi, D.E., Corradi, G.R., Cuesta, L.M., Adamo, H.P., and de Tezanos Pinto, F. (2015). The Parkinson-associated human P5B-ATPase ATP13A2 protects against the iron-induced cytotoxicity. Biochimica et biophysica acta *1848*, 1646-1655.

Rojdestvenski, I., Ivanov, A.G., Cottam, M.G., Borodich, A., Huner, N.P., and Oquist, G. (2002). Segregation of photosystems in thylakoid membranes as a critical phenomenon. Biophysical journal *82*, 1719-1730.

Rontein, D., Nishida, I., Tashiro, G., Yoshioka, K., Wu, W.I., Voelker, D.R., Basset, G., and Hanson, A.D. (2001). Plants synthesize ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme. The Journal of biological chemistry *276*, 35523-35529.

Rontein, D., Wu, W.I., Voelker, D.R., and Hanson, A.D. (2003). Mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase from higher plants. Functional complementation in yeast, localization in plants, and overexpression in Arabidopsis. Plant physiology *132*, 1678-1687.

Roston, R., Gao, J., Xu, C., and Benning, C. (2011). Arabidopsis chloroplast lipid transport protein TGD2 disrupts membranes and is part of a large complex. The Plant journal : for cell and molecular biology *66*, 759-769.

Roston, R.L., Gao, J., Murcha, M.W., Whelan, J., and Benning, C. (2012). TGD1, -2, and -3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins. The Journal of biological chemistry *287*, 21406-21415.

Roth, M.G. (2008). Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. Traffic *9*, 1233-1239.

Ruaud, A.F., Nilsson, L., Richard, F., Larsen, M.K., Bessereau, J.L., and Tuck, S. (2009). The C. elegans P4-ATPase TAT-1 regulates lysosome biogenesis and endocytosis. Traffic *10*, 88-100.

Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M., and Tanaka, K. (2004). Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in Saccharomyces cerevisiae. Molecular biology of the cell *15*, 3418-3432.

Sarkis, J., Rocha, J., Maniti, O., Jouhet, J., Vie, V., Block, M.A., Breton, C., Marechal, E., and Girard-Egrot, A. (2014). The influence of lipids on MGD1 membrane binding highlights novel mechanisms for galactolipid biosynthesis regulation in chloroplasts. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *28*, 3114-3123.

Sasser, T.L., and Fratti, R.A. (2014). Class C ABC transporters and Saccharomyces cerevisiae vacuole fusion. Cellular Logistics *4*, e943588.

Schattat, M., Barton, K., Baudisch, B., Klosgen, R.B., and Mathur, J. (2011a). Plastid stromule branching coincides with contiguous endoplasmic reticulum dynamics. Plant physiology *155*, 1667-1677.

Schattat, M., Barton, K., and Mathur, J. (2011b). Correlated behavior implicates stromules in increasing the interactive surface between plastids and ER tubules. Plant signaling & behavior *6*, 715-718.

Schauder, C.M., Wu, X., Saheki, Y., Narayanaswamy, P., Torta, F., Wenk, M.R., De Camilli, P., and Reinisch, K.M. (2014). Structure of a lipid-bound extended synaptotagmin indicates a role in lipid transfer. Nature *510*, 552-555.

Schmidt, H., and Heinz, E. (1993). Direct desaturation of intact galactolipids by a desaturase solubilized from spinach (Spinacia oleracea) chloroplast envelopes. The Biochemical journal *289 (Pt 3)*, 777-782.

Schnurr, J.A., Shockey, J.M., de Boer, G.J., and Browse, J.A. (2002). Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from Arabidopsis. Plant physiology *129*, 1700-1709.

Schroeder, B.C., Cheng, T., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2008). Expression Cloning of TMEM16A as a Calcium-Activated Chloride Channel Subunit. Cell *134*, 1019-1029.

Segawa, K., Suzuki, J., and Nagata, S. (2011). Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 19246-19251.

Seigneuret, M., and Devaux, P.F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *81*, 3751-3755.

Seu, K.J., Cambrea, L.R., Everly, R.M., and Hovis, J.S. (2006). Influence of lipid chemistry on membrane fluidity: tail and headgroup interactions. Biophysical journal *91*, 3727-3735.

Shahollari, B., Varma, A., and Oelmuller, R. (2005). Expression of a receptor kinase in Arabidopsis roots is stimulated by the basidiomycete Piriformospora indica and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. Journal of plant physiology *162*, 945-958.

Shanklin, J., and Cahoon, E.B. (1998). Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids1. Annual review of plant physiology and plant molecular biology *49*, 611-641.

Sharma, B., Joshi, D., Yadav, P.K., Gupta, A.K., and Bhatt, T.K. (2016). Role of Ubiquitin-Mediated Degradation System in Plant Biology. Frontiers in plant science *7*, 806.

Sharma, P., Varma, R., Sarasij, R.C., Ira, Gousset, K., Krishnamoorthy, G., Rao, M., and Mayor, S. (2004). Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. Cell *116*, 577-589.

Sheldon, P.S., Kekwick, R.G., Smith, C.G., Sidebottom, C., and Slabas, A.R. (1992). 3-Oxoacyl-[ACP] reductase from oilseed rape (Brassica napus). Biochimica et biophysica acta *1120*, 151-159.

Shemesh, T., Luini, A., Malhotra, V., Burger, K.N., and Kozlov, M.M. (2003). Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. Biophysical journal *85*, 3813-3827.

Shen, W., Li, J.Q., Dauk, M., Huang, Y., Periappuram, C., Wei, Y., and Zou, J. (2010). Metabolic and transcriptional responses of glycerolipid pathways to a perturbation of glycerol 3-phosphate metabolism in Arabidopsis. The Journal of biological chemistry *285*, 22957-22965.

Sherameti, I., Shahollari, B., Landsberger, M., Westermann, M., Cherepneva, G., Kusnetsov, V., and Oelmuller, R. (2004). Cytokinin stimulates polyribosome loading of nuclear-encoded mRNAs for the plastid ATP synthase in etioplasts of Lupinus luteus: the complex accumulates in the inner-envelope membrane with the CF(1) moiety located towards the stromal space. The Plant journal : for cell and molecular biology *38*, 578-593.

Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., and Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 A resolution. Nature *459*, 446-450.

Silvius, J.R. (2005). Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: insights from model-membrane studies. Biochimica et biophysica acta *1746*, 193-202.

Singer, S.D., Chen, G., Mietkiewska, E., Tomasi, P., Jayawardhane, K., Dyer, J.M., and Weselake, R.J. (2016). Arabidopsis GPAT9 contributes to synthesis of intracellular glycerolipids but not surface lipids. Journal of experimental botany *67*, 4627-4638.

Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science (New York, N.Y.) *175*, 720-731.

Slabas, A.R., and Fawcett, T. (1992). The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. Plant molecular biology *19*, 169-191.

Somerville, C., and Browse, J. (1991). Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. Science (New York, N.Y.) *252*, 80-87.

Sorensen, T.L., Moller, J.V., and Nissen, P. (2004). Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. Science (New York, N.Y.) *304*, 1672-1675.

Sparkes, I.A., Frigerio, L., Tolley, N., and Hawes, C. (2009). The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. The Biochemical journal *423*, 145-155.

Sperdouli, I., and Moustakas, M. (2012). Spatio-temporal heterogeneity in Arabidopsis thaliana leaves under drought stress. Plant biology (Stuttgart, Germany) *14*, 118-128.

Sperling, P., and Heinz, E. (1993). Isomeric sn-1-octadecenyl and sn-2-octadecenyl analogues of lysophosphatidylcholine as substrates for acylation and desaturation by plant microsomal membranes. European journal of biochemistry / FEBS *213*, 965-971.

Stalberg, K., Neal, A.C., Ronne, H., and Stahl, U. (2008). Identification of a novel GPCAT activity and a new pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in S. cerevisiae. Journal of lipid research *49*, 1794-1806.

Stone, A., and Williamson, P. (2012). Outside of the box: recent news about phospholipid translocation by P4 ATPases. Journal of chemical biology *5*, 131-136.

Stymne, S., and Stobart, A.K. (1984). Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (Carthamus tinctorius L.) cotyledons and rat liver. The Biochemical journal *223*, 305-314.

Stys, D., Stancek, M., Cheng, L., and Allen, J.F. (1995). Complex formation in plant thylakoid membranes. Competition studies on membrane protein interactions using synthetic peptide fragments. Photosynthesis research *44*, 277-285.

Suh, M.C., Samuels, A.L., Jetter, R., Kunst, L., Pollard, M., Ohlrogge, J., and Beisson, F. (2005). Cuticular Lipid Composition, Surface Structure, and Gene Expression in Arabidopsis Stem Epidermis. Plant physiology *139*, 1649-1665.

Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., and Nagata, S. (2013). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. The Journal of biological chemistry *288*, 13305-13316.

Suzuki, J., Imanishi, E., and Nagata, S. (2014). Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis. The Journal of biological chemistry *289*, 30257-30267.

Szymanski, J., Brotman, Y., Willmitzer, L., and Cuadros-Inostroza, Á. (2014). Linking Gene Expression and Membrane Lipid Composition of Arabidopsis. The Plant cell *26*, 915-928.

T S Moore, J. (1982). Phospholipid Biosynthesis. Annual Review of Plant Physiology *33*, 235-259.

Takahashi, M., Kondou, Y., and Toyoshima, C. (2007). Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences *104*, 5800-5805.

Takatsu, H., Baba, K., Shima, T., Umino, H., Kato, U., Umeda, M., Nakayama, K., and Shin, H.-W. (2011). ATP9B, a P4-ATPase (a Putative Aminophospholipid Translocase), Localizes to the trans-Golgi Network in a CDC50 Protein-independent Manner. The Journal of biological chemistry *286*, 38159-38167.

Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. Nature reviews. Molecular cell biology *8*, 37-48.

Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., and Kangawa, K. (2000). Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. Molecular cell *6*, 11-22.

Tan, T., Özbalci, C., Brügger, B., Rapaport, D., and Dimmer, K.S. (2013). Mcp1 and Mcp2, two novel proteins involved in mitochondrial lipid homeostasis. Journal of Cell Science *126*, 3563.

Tan, X., Wang, Q., Tian, B., Zhang, H., Lu, D., and Zhou, J. (2011). A Brassica napus lipase locates at the membrane contact sites involved in chloroplast development. PloS one *6*, e26831.

Tanz, S.K., Castleden, I., Hooper, C.M., Vacher, M., Small, I., and Millar, H.A. (2013). SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in Arabidopsis. Nucleic acids research *41*, D1185-1191.

Tasseva, G., Richard, L., and Zachowski, A. (2004). Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in Arabidopsis thaliana. FEBS letters *566*, 115-120.

Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E., and Provart, N.J. (2005). The Botany Array Resource: e-Northerns, Expression Angling, and promoter analyses. The Plant journal : for cell and molecular biology *43*, 153-163.

Toyoshima, C. (2009). How Ca2+-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. Biochimica et biophysica acta *1793*, 941-946.

Toyoshima, C., and Inesi, G. (2004). Structural basis of ion pumping by Ca2+-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Annual review of biochemistry *73*, 269-292.

Toyoshima, C., Iwasawa, S., Ogawa, H., Hirata, A., Tsueda, J., and Inesi, G. (2013). Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg2+-bound E1 state. Nature *495*, 260-264.

Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. Nature *418*, 605-611.

Toyoshima, C., Nomura, H., and Sugita, Y. (2003). Structural basis of ion pumping by Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. FEBS letters *555*, 106-110.

Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T., and Ogawa, H. (2007). How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 19831-19836.

Tse, Y.C., Mo, B., Hillmer, S., Zhao, M., Lo, S.W., Robinson, D.G., and Jiang, L. (2004). Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in Nicotiana tabacum BY-2 cells. The Plant cell *16*, 672-693.

Uemura, M., and Steponkus, P.L. (1994). A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. Plant physiology *104*, 479-496.

Uemura, M., and Steponkus, P.L. (1997). Effect of Cold Acclimation on the Lipid Composition of the Inner and Outer Membrane of the Chloroplast Envelope Isolated from Rye Leaves. Plant physiology *114*, 1493-1500.

Usadel, B., Nagel, A., Thimm, O., Redestig, H., Blaesing, O.E., Palacios-Rojas, N., Selbig, J., Hannemann, J., Piques, M.C., Steinhauser, D.*, et al.* (2005). Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. Plant physiology *138*, 1195-1204.

van Schooten, B., Testerink, C., and Munnik, T. (2006). Signalling diacylglycerol pyrophosphate, a new phosphatidic acid metabolite. Biochimica et biophysica acta *1761*, 151-159.

Varma, R., and Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. Nature *394*, 798-801.

Verhulst, P.M., van der Velden, L.M., Oorschot, V., van Faassen, E.E., Klumperman, J., Houwen, R.H., Pomorski, T.G., Holthuis, J.C., and Klomp, L.W. (2010). A flippase-independent function of ATP8B1, the protein affected in familial intrahepatic cholestasis type 1, is required for apical protein expression and microvillus formation in polarized epithelial cells. Hepatology (Baltimore, Md.) *51*, 2049-2060.

Vestergaard, A.L., Coleman, J.A., Lemmin, T., Mikkelsen, S.A., Molday, L.L., Vilsen, B., Molday, R.S., Dal Peraro, M., and Andersen, J.P. (2014). Critical roles of isoleucine-364 and adjacent residues in a hydrophobic gate control of phospholipid transport by the mammalian P4-ATPase ATP8A2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, E1334-1343.

Vestergaard, A.L., Mikkelsen, S.A., Coleman, J.A., Molday, R.S., Vilsen, B., and Andersen, J.P. (2015). Specific mutations in mammalian P4-ATPase ATP8A2 catalytic subunit entail differential glycosylation of the accessory CDC50A subunit. FEBS letters *589*, 3908-3914.

Vilsen, B., and Andersen, J.P. (1998). Mutation to the Glutamate in the Fourth Membrane Segment of Na+,K+-ATPase and Ca2+-ATPase Affects Cation Binding from Both Sides of the Membrane and Destabilizes the Occluded Enzyme Forms. Biochemistry *37*, 10961-10971.

Viotti, C., Luoni, L., Morandini, P., and De Michelis, M.I. (2005). Characterization of the interaction between the plasma membrane H-ATPase of Arabidopsis thaliana and a novel interactor (PPI1). The FEBS journal *272*, 5864-5871.

Vishwakarma, R.A., Vehring, S., Mehta, A., Sinha, A., Pomorski, T., Herrmann, A., and Menon, A.K. (2005). New fluorescent probes reveal that flippase-mediated flip-flop of phosphatidylinositol across the endoplasmic reticulum membrane does not depend on the stereochemistry of the lipid. Organic & Biomolecular Chemistry *3*, 1275-1283.

Wada, H., Schmidt, H., Heinz, E., and Murata, N. (1993). In vitro ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacterial thylakoid membranes. Journal of bacteriology *175*, 544-547.

Walsh, M.C., Klopfenstein, W.E., and Harwood, J.L. (1990). The short chain condensing enzyme has a widespread occurrence in the fatty acid synthetases from higher plants. Phytochemistry *29*, 3797-3799.

Wang, Z., and Benning, C. (2012). Chloroplast lipid synthesis and lipid trafficking through ER-plastid membrane contact sites. Biochemical Society transactions *40*, 457-463.

Wang, Z., Xu, C., and Benning, C. (2012). TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. The Plant journal : for cell and molecular biology *70*, 614-623.

Warren, D.T., Andrews, P.D., Gourlay, C.W., and Ayscough, K.R. (2002). Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. Journal of Cell Science *115*, 1703.

Wicky, S., Schwarz, H., and Singer-Kruger, B. (2004). Molecular interactions of yeast Neo1p, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and its role in membrane trafficking within the endomembrane system. Molecular and cellular biology *24*, 7402-7418.

Williams, J.P., Imperial, V., Khan, M.U., and Hodson, J.N. (2000). The role of phosphatidylcholine in fatty acid exchange and desaturation in Brassica napus L. leaves. The Biochemical journal *349*, 127-133.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PloS one *2*, e718.

Xiao, S., Chen, Q.F., and Chye, M.L. (2009). Light-regulated Arabidopsis ACBP4 and ACBP5 encode cytosolic acyl-CoA-binding proteins that bind phosphatidylcholine and oleoyl-CoA ester. Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale *47*, 926-933.

Xiao, S., and Chye, M.-L. (2011). New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism. Progress in lipid research *50*, 141-151.

Xu, C., Fan, J., Cornish, A.J., and Benning, C. (2008). Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in Arabidopsis requires the extraplastidic TGD4 protein. The Plant cell *20*, 2190-2204.

Xu, C., Fan, J., Froehlich, J.E., Awai, K., and Benning, C. (2005). Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in Arabidopsis. The Plant cell *17*, 3094-3110.

Xu, C., Moellering, E.R., Muthan, B., Fan, J., and Benning, C. (2010). Lipid transport mediated by Arabidopsis TGD proteins is unidirectional from the endoplasmic reticulum to the plastid. Plant & cell physiology *51*, 1019-1028.

Xu, P., Okkeri, J., Hanisch, S., Hu, R.Y., Xu, Q., Pomorski, T.G., and Ding, X.Y. (2009). Identification of a novel mouse P4-ATPase family member highly expressed during spermatogenesis. J Cell Sci *122*, 2866-2876.

Yang, H., Kim, A., David, T., Palmer, D., Jin, T., Tien, J., Huang, F., Cheng, T., Coughlin, Shaun R., Jan, Yuh N.*, et al.* (2012a). TMEM16F Forms a Ca2+-Activated Cation Channel Required for Lipid Scrambling in Platelets during Blood Coagulation. Cell *151*, 111-122.

Yang, S., Chen, C., Wang, H., Rao, X., Wang, F., Duan, Q., Chen, F., Long, G., Gong, W., Zou, M.H.*, et al.* (2012b). Protective effects of Acyl-coA thioesterase 1 on diabetic heart via PPARalpha/PGC1alpha signaling. PloS one *7*, e50376.

Yang, Y.D., Cho, H., Koo, J.Y., Tak, M.H., Cho, Y., Shim, W.S., Park, S.P., Lee, J., Lee, B., Kim, B.M.*, et al.* (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. Nature *455*, 1210-1215.

Yokoi, S., Higashi, S.-I., Kishitani, S., Murata, N., and Toriyama, K. (1998). Introduction of the cDNA for shape Arabidopsis glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. Molecular Breeding *4*, 269-275.

Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., and Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. Nat. Protocols *2*, 1565-1572.

Yoshida, S., and Uemura, M. (1984). Protein and Lipid Compositions of Isolated Plasma Membranes from Orchard Grass (Dactylis glomerata L.) and Changes during Cold Acclimation. Plant physiology *75*, 31-37.

Yoshida, S., and Uemura, M. (1986). Lipid Composition of Plasma Membranes and Tonoplasts Isolated from Etiolated Seedlings of Mung Bean (Vigna radiata L.). Plant physiology *82*, 807-812.

Yurchenko, O.P., Nykiforuk, C.L., Moloney, M.M., Stahl, U., Banas, A., Stymne, S., and Weselake, R.J. (2009). A 10-kDa acyl-CoA-binding protein (ACBP) from Brassica napus enhances acyl exchange between acyl-CoA and phosphatidylcholine. Plant biotechnology journal *7*, 602-610.

Zelazny, E., Barberon, M., Curie, C., and Vert, G. (2011). Ubiquitination of transporters at the forefront of plant nutrition. Plant signaling & behavior *6*, 1597-1599.

Zhang, L., and Sakamoto, W. (2013). Possible function of VIPP1 in thylakoids: protection but not formation? Plant signaling & behavior *8*, e22860.

Zhang, X., and Oppenheimer, D.G. (2009). IRREGULAR TRICHOME BRANCH 2 (ITB2) encodes a putative aminophospholipid translocase that regulates trichome branch elongation in Arabidopsis. The Plant journal : for cell and molecular biology *60*, 195-206.

Zhou, M., Politis, A., Davies, R.B., Liko, I., Wu, K.-J., Stewart, A.G., Stock, D., and Robinson, C.V. (2014). Ion mobility–mass spectrometry of a rotary ATPase reveals ATP-induced reduction in conformational flexibility. Nat Chem *6*, 208-215.

Annexes:

gène	ID	Primer pour clonage BiFC et GFP/CFP		Primer pour Génotypage	
ALA10	At3g25610	ALA10 BiFC Fw	CACCATGGCTGGTCCAAGTCGGAG	ALA10 Fw	ATGGCTGGTC CAAGTCGGAG
		AL10 BiFC Rv	GACACCGACAAGATCCTTATAGATCTGATC	ALA10Rv	GACACCGACAAGATCCTTA
ALIS 1	At3g12740	ALIS1 BiFC Fw	CACCATGTCTTCTTCTAACACGCCATCTTCT	ALIS1 WT Fw	CCTAAGCGTATGAAGCAGCCT
		ALIS1 BiFC Rv	ACGACCTCCAGGAATTCTGTTCC	ALIS 1 WT Rv	TAGGTAGGATCACCGAGTCGC
ALIS2	At5g46150	ALIS2 BiFC Fw	CACCATGGAAGTGGAAGGATCGATGAATCG		
		ALIS2 BiFC Rv	ATTCTTGGAACAAGAAAAGCCTTTCAAGT		
ALIS3	At1g54320	ALIS3 BiFC Fw	CACCATGAGTTCCAATACGGCGTCGT		
		ALIS3 BiFC Rv	CCGACCTCCAGGATTTCTATTCCA		
ALIS5	At1g79450	ALIS5 BiFC Fw	CACCATGAGTTCCACCGCGGC	ALIS5 WT Fw	AAACGACTCATGCCGTCCAT
		ALIS5 BiFC Rv	CTGTAAACCTCCAGCACTTCTGTTC	ALIS5 WT Rv	ACAACCCCAGCGACAAGAAA
FAD2	At3g12120	FAD2 BiFC Fw	CACCATGGGTGCAGGTGGAAGAATG		
		FAD2 BiFC Rv	TAACTTATTGTTGTACCAGTACACACCTTTCT		
FAD3	At2g29980	FAD3 BIFC Fw	CCACATGGTTGTTGCTATGGACCAACG		
		FAD3 BiFC Rv	ATTGATTTTAGATTTGTCAGAAGCGTAAACGT		
PUB11	At1g23030	PUB11 WT Fw	CAACATGCCGGAATGTTCAAG	PUB11 WT Fw	ACACCGGAATGTTCAAGAAGG
		PUB11 WT Rv	TGTCCTGCCGTTAATGTAACCTG	PUB11 WT Rv	TGTCCTGCCGTTAATGTAACCTG

Annexe 1: Liste des amorces utlisés. *Les amorces (environ 20 nucléotides) ont été dessinées afin d'optimiser leur spécificité, de réduire la formation de dimères et de structures secondaires, des extrémités terminées par G ou C afin d'avoir une meilleure cohésion et de posséder une température de fusion comprise entre 55°C et 63°*

Mesures Chloroplastes et Thyllacoides:

```
run("8-bit");
run("Smooth");
run("Smooth");
run("Smooth");
run("Smooth");
run("Smooth");
run("Smooth");
run("Smooth");
//setTool("freehand");
waitForUser( "Pause","where is my chloroplast enveloppe? \n");
run("Measure")
run("Enhance Local Contrast (CLAHE)", "blocksize=99 histogram=256 maximum=3 mask=*None*");
run("Invert");
setBackgroundColor(0, 0, 0);
run("Clear Outside");
run("Find Maxima...", "noise=100 output=[Maxima Within Tolerance]");
run("Close-");
run("Close-");
//run("Threshold...");
//setThreshold(31, 255);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
waitForUser( "Pause","please clear noise by hand \n ");
run("Analyze Particles...", "size=0.01-Infinity show=[Overlay Masks] display exclude in_situ");
```

Annexe 2 : Code de la macro utilisée sur le logiciel ImageJ/Fidji pour mesure des chloroplastes et des thyllacoïdes. *L'outil "Measure" est paramétré pour mesurer l'aire et le périmetre des chloroplastes. Ensuite l'outil "Analyse particule"permet, après amélioration du contraste, lissage, et suppréssion du bruit de fond automatique (demande a l'utilisateur de vérifiaction par l'utilisateur avant mesure), la mesure de l'aire des thyllacoides.*

Materials and Methods

1) Cloning

The coding sequence of aa 1134-1202 of *Arabidopsis thaliana* ALA10 (AT3G25610) was PCR-amplified and cloned in frame with the Gal4 DNA binding domain (DBD) into plasmid pB66 pB27 (N-Gal4-ALA10-C), derived from pAS2ΔΔ (Fromont-Racine et al., 1997). The DBD construct was checked by sequencing the entire insert. Hybrigenics reference for this bait is hgx3232v2_pB66.

The prey fragments for Arabidopsis thaliana AT1G23030 (clone number ATH_RP1_hgx3232v2_pB66_A-75) and AT3G27960 (clone number ATH_RP1_hgx3232v2_pB66_A-65) were extracted from the ULTImate Y2H™ screening of ALA10 (aa 1134-1102) against an Arabidopsis 1-week old seedlings cDNA library. The prey fragments were cloned in frame with the Gal4 Activation Domain (AD) into plasmid pP6, derived from the original pGADGH (Bartel et al., 1993).

The pP7 prey plasmid used in the control assay is derived from the pP6 plasmid.

2) 1-by-1 Y2H interaction assays

Bait and prey constructs were transformed in the yeast haploid cells, respectively CG1945 (mata) and YHGX13 (Y187 ade2-101::loxP-kanMX-loxP, matα) strains. The diploid yeast cells were obtained using a mating protocol with both yeast strains (Fromont-Racine *et al.*, 1997). These assays are based on the HIS3 reporter gene (growth assay without histidine).

The following interaction pairs were tested:

1) Hybrigenics' positive control (Smad3 / Smurf1, Colland et al., 2004)
2) empty Gal4 bait vector / empty prey vector (negative control)
3) empty Gal4 bait vector / AT1G23030 (negative control)
4) ALA10_C-ter / empty prey vector (negative control)
5) ALA10_C-ter / AT1G23030
6) empty Gal4 bait vector / AT3G27960 (negative control)
7) ALA10_C-ter / empty prey vector (negative control)
8) ALA10_C-ter / AT3G27960

Growth assay on +/-His and +/- 3-AT plates

Interaction pairs were tested in duplicate as two independent clones from each diploid were picked for the growth assay. For each interaction, several dilutions (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} and 10^{-4}) of the diploid yeast cells (culture normalized at 5×10^{4} cells) and expressing both bait and prey constructs were spotted on several selective media. The DO-2 selective medium lacking tryptophan and leucine was used as a growth control and to verify the presence of both the bait and prey plasmids. The different dilutions were also spotted on a selective medium without tryptophan, leucine and histidine (DO-3). Four different concentrations of 3-AT, an inhibitor of the HIS3 gene product, were added to the DO-3 plates to increase stringency and reduce possible autoactivation by ALA10, AT1G23030 and AT3G27960. The following 3-AT concentrations were tested: 1, 5, 10 and 50 mM.

Quantitative β-galactosidase assay

In this assay, all interaction pairs were tested in duplicate. Yeast cells expressing both DBD and AD constructs were grown in a selective medium without tryptophan and leucine. β-galactosidase activity was quantitated by the conversion of o-nitrophenyl- β-galactoside (ONPG) into o-nitrophenol, as measured by the optical density of the suspension at 420 nm. Values were normalized by the optical density at 600 nm that reflects the amount of yeast cells in the tube. Mean Standard Deviation were calculated for each interaction pair in Miller's β-galactosidase units (1 unit hydrolyzes 1 µmol of ONPG per min per cell).

References

Bartel, P.L., Chein, C.T., Sternglanz, R., & Fields, S. (1993) in *Cellular interactions in development: A practical approach*. ed. Hartley, D.A.. (Oxford University Press, Oxford) pp. 153-179.

Colland F, Jacq X, Trouplin V, Mougin C, Groizeleau C, Hamburger A, Meil A, Wojcik J, Legrain P, Gauthier JM. (2004). Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. *Genome Res.* 14, 1324-32.

Fromont-Racine, M., Rain, J.C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* **16:** 277-282.

Results

Solid growth tests on +/- Histidine and +/- 3-AT plates and quantitative β-galactosidase assay

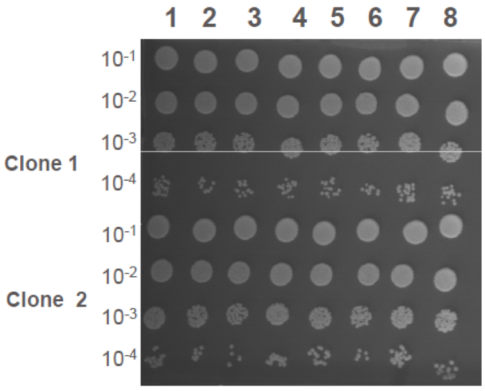
Legend to Figures

ALA10_C-ter: aa 1134-1102 of A. thaliana ALA10 cloned in frame with the Gal4 DNA-binding domain in vector pB66
AT1G23030: aa 1-509 of A. thaliana AT1G23030 cloned in frame with the gal4 activation domain in vector pP6
AT3G27960: aa 193-500 of A. thaliana AT3G27960 cloned in frame with the gal4 activation domain in vector pP6

pB66: GAL4-DNA-Binding Domain vector, i.e. bait vector
pB66ø: empty pB66 vector
pP7/pP6: Gal4 Activation Domain vector, i.e. prey vector. The same AD protein is expressed from both plasmids.
pP7ø: empty pP7 vector

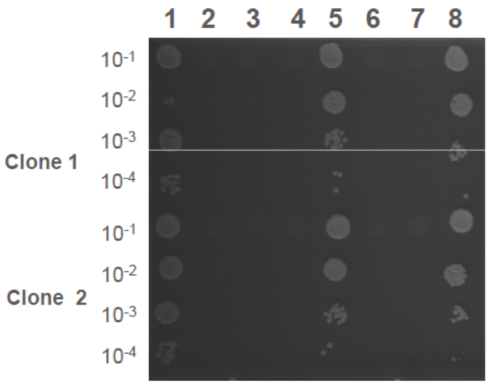
DO-2: selective medium without tryptophan and leucine
DO-3: selective medium without tryptophan, leucine and histidine
3-AT: 3-aminotriazole

DO-2



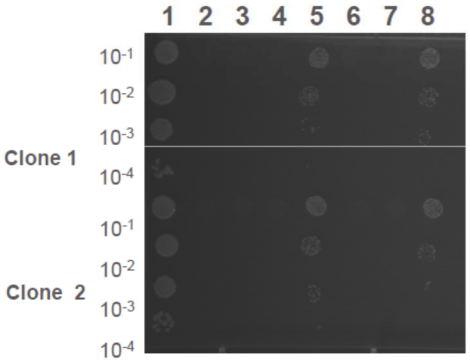
1 - Hybrigenics' Positive Control
2 - Negative Control: pB66ø / pP7ø
3 - Negative Control: pB66ø / AT1G23030
4 - Negative Control: ALA10_C-ter/ pP7ø
5 - ALA10_C-ter / AT1G23030
6 - Negative Control: pB66ø / AT3G27960
7 - Negative Control: ALA10_C-ter / pP7ø
8 - ALA10_C-ter / AT3G27960

DO-3



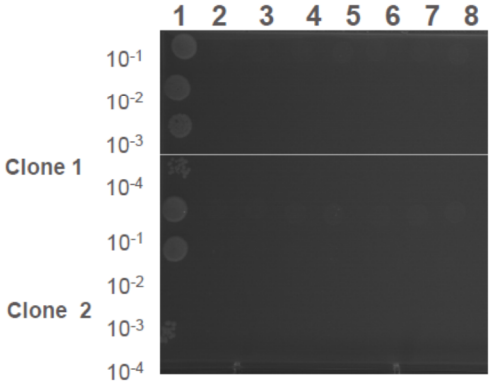
1 - Hybrigenics' Positive Control
2 - Negative Control: pB66ø / pP7ø
3 - Negative Control: pB66ø / AT1G23030
4 - Negative Control: ALA10_C-ter/ pP7ø
5 - ALA10_C-ter / AT1G23030
6 - Negative Control: pB66ø / AT3G27960
7 - Negative Control: ALA10_C-ter / pP7ø
8 - ALA10_C-ter / AT3G27960

DO-3 + 1 mM 3AT



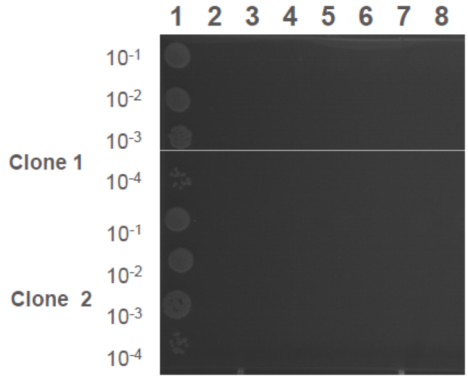
1 - Hybrigenics' Positive Control
2 - Negative Control: pB66ø / pP7ø
3 - Negative Control: pB66ø / AT1G23030
4 - Negative Control: ALA10_C-ter/ pP7ø
5 - ALA10_C-ter / AT1G23030
6 - Negative Control: pB66ø / AT3G27960
7 - Negative Control: ALA10_C-ter / pP7ø
8 - ALA10_C-ter / AT3G27960

DO-3 + 5 mM 3AT



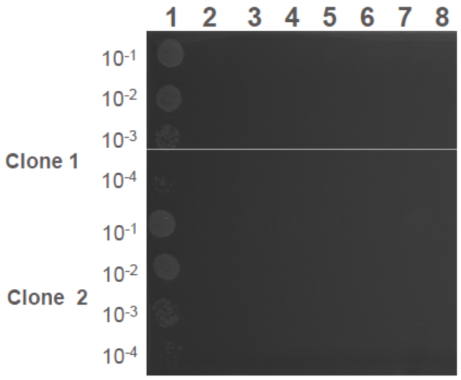
1 - Hybrigenics' Positive Control
2 - Negative Control: pB66ø / pP7ø
3 - Negative Control: pB66ø / AT1G23030
4 - Negative Control: ALA10_C-ter/ pP7ø
5 - ALA10_C-ter / AT1G23030
6 - Negative Control: pB66ø / AT3G27960
7 - Negative Control: ALA10_C-ter / pP7ø
8 - ALA10_C-ter / AT3G27960

DO-3 + 10 mM 3AT



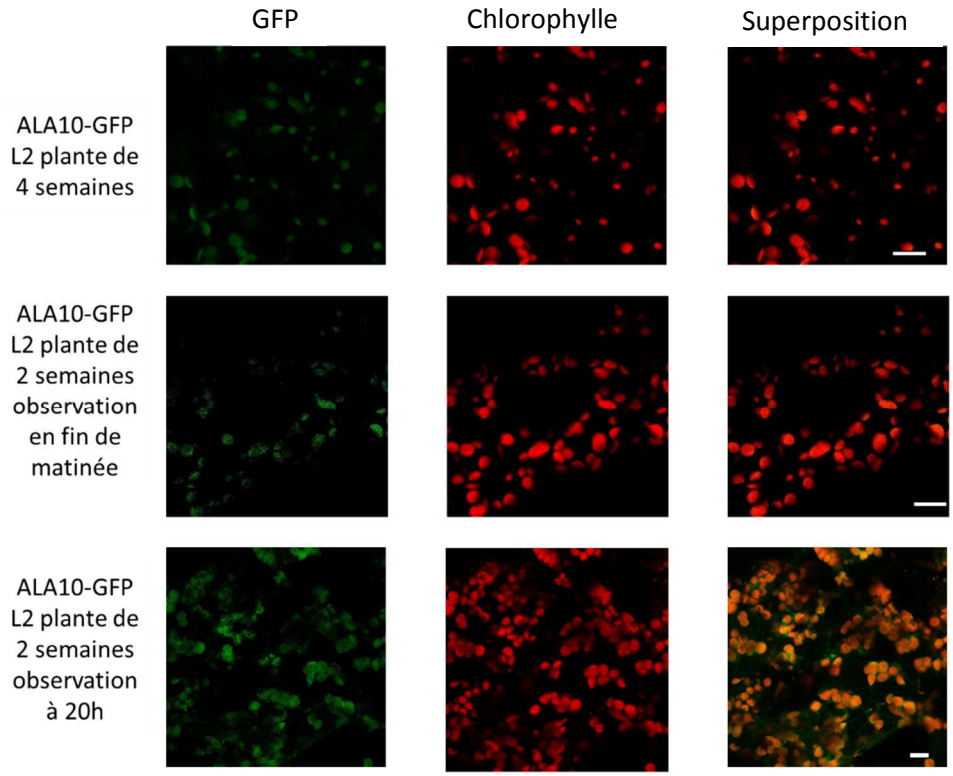
1 - Hybrigenics' Positive Control
2 - Negative Control: pB66ø / pP7ø
3 - Negative Control: pB66ø / AT1G23030
4 - Negative Control: ALA10_C-ter/ pP7ø
5 - ALA10_C-ter / AT1G23030
6 - Negative Control: pB66ø / AT3G27960
7 - Negative Control: ALA10_C-ter / pP7ø
8 - ALA10_C-ter / AT3G27960

DO-3 + 50 mM 3AT



1 - Hybrigenics' Positive Control
2 - Negative Control: pB66ø / pP7ø
3 - Negative Control: pB66ø / AT1G23030
4 - Negative Control: ALA10_C-ter/ pP7ø
5 - ALA10_C-ter / AT1G23030
6 - Negative Control: pB66ø / AT3G27960
7 - Negative Control: ALA10_C-ter / pP7ø
8 - ALA10_C-ter / AT3G27960

Annexe 4: Détection d'ALA10 GFP en microscopie confocale en fonction de l'heure de la journée et du stade de développement. Images classiquement obtenues lors des observations de la lignée L2 en fonction du cycle circadien et du stade de dévelopement. La présence de signal dans le canal GFP au niveau des chloroplastes est due à l'autofluorescence de la chlorophylle. On ne détecte de signal GFP en dehors des chloroplastes quasi exclusivement en fin de journée et uniquement avant la troisième semaine de croissance. Barre d'échelle 20µm.



Résumé de la thèse en français:

Dans les cellules eucaryotes, chaque membrane a une composition lipidique qui lui est propre. La composition des membranes est finement régulée en fonction des conditions environnementales et physiologiques de la plante. Cette homéostasie lipidique est le résultat des processus de synthèse, conversion, dégradation et de trafic des lipides. Si la majorité des enzymes impliqués dans le métabolisme des lipides est identifiée, la majorité des mécanismes de transferts intermembranaires des lipides reste à caractériser. Nous nous concentrons sur l'homéostasie lipidique des chloroplastes et plus particulièrement celle des galactolipides, lipides essentiels des membranes photosynthétiques. Les galactolipides sont synthétisés au niveau de l'enveloppe des chloroplastes. Cependant, une grande partie des galactolipides proviennent de la phosphatidylcholine, elle-même synthétisée dans le réticulum endoplasmique. Cette délocalisation de la voie de synthèse sur deux compartiments souligne l'importance de l'étape de transfert lipidique associé.
Des études transcriptomiques ont montré qu'ALA10, une ATPase de type P4, flippase de phospholipides, est surexprimée dans des conditions faisant varier la synthèse des galactolipides, telles que l'inhibition chimique des MGDG synthases par la galvestine-1 ou la carence de phosphate.
Le but de cette thèse est de caractériser ALA10 et d'analyser son rôle dans ce trafic lipidique et dans l'homéostasie des galactolipides chloroplastiques.
Pour comprendre le rôle d'ALA10, nous avons d'abord étudié sa localisation subcellulaire à l'aide d'une fusion traductionnelle avec la GFP et effectué des analyses lipidiques de différentes lignées exprimant ALA10 à différents niveaux. L'analyse de la composition lipidique indique qu'ALA10 stimule la synthèse des galactolipides et limite la désaturation de la phosphatidylcholine dans le réticulum endoplasmique. Nous avons recherché les partenaires protéiques potentiels d'ALA10 permettant d'expliquer ces effets et utilisé une approche de complémentation de fluorescence bimoléculaire afin d'étudier ces interactions. Nous avons pu déterminer qu'ALA10 interagit avec ALIS1 et ALIS5, deux sous-unités beta potentiellement nécessaires à la localisation et à la fonction d'ALA10, et confirmer leurs colocalisation avec ALA10 à l'aide de fusions GFP/CFP. ALA10 peut être localisée dans le réticulum endoplasmique à proximité des chloroplastes avec ALIS5 ou au niveau de la membrane plasmique avec ALIS1. Nous avons aussi pu déterminer qu'ALA10 interagit avec l'acide gras désaturase, FAD2, et une E3-ubiquitine ligase, PUB11. L''interaction avec FAD2 confirme un lien entre ALA10 et la désaturation de la phosphatidylcholine.
Nous avons ensuite étudié l'effet d'ALIS1 et d'ALIS5 sur la fonction d'ALA10 en utilisant des lignées n'exprimant pas ces protéines ou les surexprimant avec ALA10. L'observation en microscopie électronique a révélé que la forme des chloroplastes et leurs relations avec le système endomembranaire sont modifiées en fonction de l'ALIS coexprimée avec ALA10. Les analyses lipidiques effectuées sur les plantes mutantes confirment un effet d'ALA10 sur l'homéostasie des galactolipides et la désaturation de la phosphatidylcholine. Les résultats suggèrent plusieurs fonctions d'ALA10, dépendantes de l'ALIS. Cet effet apparait variable en fonction de la photopériode ou du rythme circadien et indiquent une régulation post traductionnelle d'ALA10. Le rôle de PUB11 dans cette régulation a été exploré.
Au final, cette étude révèle que, dans les cellules chlorophylliennes, ALA10, une flippase de phospholipides du réticulum endoplasmique, est impliquée dans la dynamique de désaturation de la phosphatidylcholine. Son activité stimule la synthèse des galactolipides et active la biogénèse des membranes photosynthétiques, probablement, en favorisant les échanges de lipides entre le chloroplaste et le réticulum endoplasmique.

Résumé de la thèse en anglais:

In a eukaryotic cell, each membrane compartment has a specific lipid composition, regulated according to physiological and environmental conditions. This lipid homeostasis results from coordination of lipid synthesis, conversion, degradation and trafficking. Whereas most enzymes involved in lipid metabolism are now identified, most steps of lipid transport remain to be characterized. We focus on the chloroplast lipid homeostasis, particularly on galactolipid homeostasis, essential lipids of photosynthetic membranes. This lipids are synthetized within the chloroplast's envelope. However, a majority of galactolipids derived from phosphatidylcholine which is synthetized in the endoplasmic reticulum. The delocalization of this synthesis pathway underline the importance of the associated lipid trafficking.
Transcriptomic studies have highlighted that ALA10 is overexpressed in condition modifying the galactolipids synthesis such as the chemical inhibition of MGDG synthesis by the galvestine-1, or during phosphate starvation.
The aim of this thesis is to characterize ALA10, analyzing its role concerning this lipid trafficking and the chloroplastic galactolipid homeostasis.
To understand ALA10's role, we firstly have used GFP fusion to determine its subcellular localization and analyzed lipid composition of different plant lines expressing ALA10 at different levels. Lipid analysis show that ALA10 boosts galactolipid synthesis and limits endoplasmic reticulum located phosphatidylcholine desaturation. We searched ALA10's potential partners in order to explain this effects and studied their interaction using a bimolecular fluorescence complementation approach. We determined that ALA10 interacts with ALIS1 and ALIS5, two beta subunit potentially necessary for ALA10's localization and function, and confirmed the colocalization of these proteins with ALA10 using GFP/CFP fusions. ALA10 with ALIS5 can localize within the endoplasmic reticulum in close proximity to chloroplast, or near the plasma membrane with ALIS1. We have also determined that ALA10 interacts with a fatty acid desaturase, FAD2 and with an E3-ubiquitine ligase PUB11. FAD2 interaction confirms the link between ALA10 and phosphatidylcholine desaturation.
Then we have studied the ALIS1 and ALIS5 effect on ALA10 function using KO lines for these proteins or overexpressor lines in conjunction with ALA10 overexpression. Electron microscopy observation revealed that the chloroplast morphology and their relations with endomembrane system are modified depending of the ALIS expressed with ALA10. Lipid analysis on KO lines confirms an impact of ALA10 on galactolipids homeostasis as well as in phosphatidylcholine desaturation. This effect appears to be variable depending of the photoperiod or the circadian rhythm indicating a post traductional regulation of ALA10. The role of PUB11 in this regulation have been studied. Finally this study reveal that, in chlorophyll cells, the endoplasmic reticulum phospholipid flippase ALA10 is involved in the desaturation process of phosphatidylcholine. Its activity stimulates galactolipid synthesis and activates biogenesis of photosynthetic membranes, probably by promoting lipids exchange between chloroplasts and endoplasmic reticulum.