



HAL
open science

Développement, architecture et dynamique des gouttelettes lipidiques de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*

Josselin Lupette

► **To cite this version:**

Josselin Lupette. Développement, architecture et dynamique des gouttelettes lipidiques de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*. Biologie végétale. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV039 . tel-02116000

HAL Id: tel-02116000

<https://theses.hal.science/tel-02116000>

Submitted on 30 Apr 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie Végétale**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Josselin LUPETTE

Thèse dirigée par **Eric MARÉCHAL (CEA Grenoble)** et codirigée par **Yvon JAILLAIS (ENS Lyon)**, préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale** dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**.

Développement, Architecture et Dynamique des gouttelettes lipidiques de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*

Thèse soutenue publiquement le **30 Novembre 2018**, devant le jury composé de :

Christelle BRETON

Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes (Présidente)

Sébastien BAUD

Directeur de recherche CNRS, IJPB Versailles (Rapporteur)

Frédéric CARRIÈRE

Directeur de recherche CNRS, Université Aix-Marseille, (Rapporteur)

Yonghua LI-BEISSON

Chercheur, CEA Cadarache (Examinatrice)

Eric MARÉCHAL

Directeur de recherche CNRS, CEA Grenoble (Directeur de thèse)

Yvon JAILLAIS

Directeur de recherche CNRS, ENS Lyon (Co-directeur de thèse)



Remerciements

Je souhaite remercier dans un premier temps Norbert Rolland de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire. Ma thèse aura été l'occasion d'assister à la passation de direction de l'unité avec mon directeur de thèse Eric Maréchal. Je tiens à te remercier chaleureusement Eric de m'avoir encadré pendant ces trois années de thèse. J'ai apprécié nos échanges scientifiques et la rigueur que tu m'as transmise tout au long de ma thèse. Tu m'as donné la possibilité de participer à des congrès internationaux incroyables au Japon, aux Etats-Unis et en Allemagne pendant ces trois années et je te remercie de ta confiance. Je tiens également à remercier Yvon Jaillais d'avoir co-encadré cette thèse, nos échanges scientifiques sont toujours enrichissants et passionnants.

J'exprime ma reconnaissance aux membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse : Christelle Breton, Sébastien Baud, Frédéric Carrière et Yonghua Li-Beisson. J'adresse un remerciement particulier à Yonghua Li-Beisson qui a également accepté de participer à deux reprises, au côté de Till Ischebeck, à mes comités de suivi de thèse.

Ce manuscrit de thèse porte mon nom, mais c'est avant tout un travail d'équipe. Chacune et chacun d'entre vous avez apporté une brique à sa construction. Je tiens à remercier, dans un premier temps, Juliette Jouhet et Fabrice Rébeillé, nos super experts lipides avec qui il est toujours passionnant de discuter. Je remercie Fabrice de m'avoir intégré, en temps qu'électron libre (e^-), dans l'équipe TransAlg. J'en profite donc pour remercier l'intégralité des membres de l'équipe TransAlg : Alberto, Christian, Khawla, Mathilde, Younès, Suzanne, Marine, Cécile, Coralie et Martin avec qui j'ai passé des super moments dans le bureau 443. Je remercie également l'intégralité de l'équipe Total pour leur gentillesse et leur bonne humeur quotidienne : Séverine, Élodie, Mariette, Julie, Clément, Sébastien, Mehdi, Camille, Aurélie, Morgane L., Natacha et Guillaume. J'exprime également mes sincères remerciements à Catherine, Maryse et Valérie qui m'ont pris sous leurs ailes pendant ma thèse, notamment pour l'étude des lipides et des protéines.

Je tiens à remercier chaleureusement Antoine Jaussaud que j'ai eu la chance de co-encadrer pendant ces deux stages de Master 1 et Master 2, au côté d'Eric Maréchal et Marina Gromova. Ce fût une véritable bouffée d'oxygène pour moi de pouvoir travailler avec toi, je ne retiens que du positif de notre travail. J'espère venir voir tes chèvres à la ferme prochainement.

J'ai eu la chance de bénéficier de l'expertise de nombreuses personnes pendant cette thèse et je tiens également à les remercier : Sabine Brugière, Yohann Couté et Marianne Tardif

pour les analyses protéomiques, Marina Gromova pour les analyses RMN, Hubert Schaller pour les analyses de stérol, Marcel Kuntz pour les analyses de pigments, Denis Falconet, Pierre-Henry Jouneau et Jean-Luc Putaux pour les observations de microscopie électronique ainsi que Claire Vigor et Thierry Durand pour les analyses d'isoprostanoïdes.

Des remerciements chaleureux vont à notre superbe équipe administrative, tenant d'une main de maître le labo : la pilote d'avion Sophie et sa co-pilote Tiffany ainsi que Danielle et Sébastien.

Je n'oublie pas le reste de l'équipe, les autres membres du laboratoire, ainsi que les étudiants en thèse et post-doctorants que j'ai pu croiser : Mélissa, Manu, Morgane M., Laurent, Johan, Dimitris, Angeliki, Sylvie, Stéphane, Claude, Jacques, Jacqueline, Olivier B., Olivier C., Félix, Juliette S., Sylvaine, Clarisse, Sassia, César, Coline, Florian, Nelson, Pauline, Imen, Maha,...

Mes derniers remerciements vont à ma famille qui m'encourage (et me subit souvent aussi) dans les bons comme dans les mauvais moments : mes parents, mon frère Sébastien, mon beau-père Liassine, ainsi que ma belle-famille ; Marie-Claude, Margaux et Sébastien et notre grande famille d'animaux : Boubou, Momo Jujune, Titi Léon, Némó, Sparrow, Fripouille et Oscar. Mes derniers mots sont pour Julie, ma moitié, sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur.

Table des matières

Introduction Générale	1
1. Généralité sur les glycérolipides	3
1.1. Les acides gras	3
1.1.1. Définition.....	3
1.1.2. Nomenclature des acides gras.....	3
1.1.3. Intérêts biotechnologiques des acides gras chez les microalgues.....	4
1.2. Les glycérolipides	8
1.2.1. Définition, nomenclature et propriétés physiques.....	8
1.2.2. Les précurseurs des glycérolipides.....	9
1.2.3. Les phosphoglycérolipides.....	10
1.2.4. Les glycoglycérolipides.....	11
1.2.5. Les bétaine lipides.....	13
1.2.6. Méthodes d'étude des glycérolipides.....	14
2. La gouttelette lipidique	15
2.1. Découverte des gouttelettes lipidiques.....	15
2.2. Architecture générale des gouttelettes lipidiques	15
2.3. Méthodes de détection des gouttelettes lipidiques	17
2.4. Méthodes de purification des gouttelettes lipidiques	17
Données Bibliographiques	19
Partie 1 : Les diatomées et le modèle d'étude <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	21
1. Généralité sur les diatomées	21
1.1. Les diatomées sont des <i>Heterokonta</i>	20
1.2. Les Heterokonta sont des organismes complexes issus d'une endosymbiose secondaire	22
1.3. Morphologie des diatomées.....	22
1.4. Cycle de vie des diatomées	26
1.5. Importance écologique des diatomées.....	27
2. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	27
2.1. Découverte et classification taxonomique.....	27
2.2. Pléomorphisme de <i>Phaeodactylum</i>	27
2.3. Un modèle de génétique fonctionnelle.....	28
2.4. Un modèle pour tenter de reprogrammer le métabolisme des lipides ?.....	31
2.4.1. La synthèse des acides gras.....	31
2.4.2. Le transfert des acides gras du chloroplaste vers le cytosol.....	33
2.4.3. La synthèse des glycérolipides.....	34
2.4.3.1. La synthèse des glycérolipides chloroplastiques.....	34
2.4.3.2. La synthèse des triacylglycérols.....	37
2.4.3.2.1. La voie de Kennedy	37
2.4.3.2.2. Une voie de synthèse impliquant la PC ?	38
Partie 2 : Architecture des gouttelettes lipidiques à travers l'arbre du vivant	40
1. Les gouttelettes lipidiques au sein des cellules procaryotes	40
1.1. Les bactéries accumulatrices de polyhydroxyalcanoates (PHAs).....	40
1.2. Les bactéries accumulatrices de triacylglycérols (TAGs) et de cérides (Wax esters)	43
1.3. Les bactéries pathogènes	44
2. « Détournement » des gouttelettes lipidiques par des virus	45
3. Les gouttelettes lipidiques au sein des cellules eucaryotes	47
3.1. Les <i>Opisthokonta</i>	47
3.1.1. Les métazoaires.....	47
3.1.1.1. Les <i>Mammalia</i>	47
3.1.1.1.1. Les périlipines sont les protéines majoritaires	47

3.1.1.1.2. Les périlipines sont régulées transcriptionnellement par les récepteurs PPAR.....	51
3.1.1.1.3. Des acteurs protéiques de la gouttelette lipidique impliqués dans des physiopathologies humaines.....	54
3.1.1.2. Les <i>Arthropoda</i>	57
3.1.1.3. Les <i>Nematoda</i>	58
3.1.2. Les levures.....	59
3.1.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
3.1.2.2. Autres modèles d'études.....	60
3.2. Les <i>Amoebozoa</i>	61
3.3. Les eucaryotes photosynthétiques issus d'une endosymbiose primaire.....	62
3.3.1. Les <i>Viridiplantae</i>	63
3.3.1.1. Les protéines de gouttelettes lipidiques de plantes sont divisées en trois groupes fonctionnels.....	63
3.3.1.1.1. Les oléosines.....	63
3.3.1.1.2. Les caléosines, les stéroléosines et les dioxygénases.....	65
3.3.1.1.3. Les protéines associées à la gouttelette lipidique	66
3.3.1.2. Les gouttelettes lipidiques « <i>oleosin-based</i> » (OLD).....	66
3.3.1.2.1. Phylogénie moléculaire des oléosines.....	66
3.3.1.2.2. Diversité et complexité des OLD.....	67
3.3.1.3. Les gouttelettes lipidiques « <i>non-oleosin-based</i> » (NOLD).....	70
3.3.1.3.1. Les particules de caoutchouc.....	70
3.3.1.3.2. Les plastoglobules.....	70
3.3.2. Les <i>Chlorophyta</i> (algues vertes).....	71
3.4. Les endosymbiontes secondaires.....	72
3.4.1. Les organismes issus de la lignée verte : les <i>Euglenozoa</i>	73
3.4.2. Les organismes issus de la lignée rouge : les <i>Chromalveolata</i>	73
3.4.2.1. Les <i>Chromerida</i>	73
3.4.2.2. Les <i>Apicomplexa</i>	74
3.4.2.3. Les <i>Dinophyta</i>	74
3.4.2.4. Les <i>Haptophyta</i>	75
3.4.2.5. Les <i>Heterokonta</i>	75
Partie 3 : Les gouttelettes lipidiques, des structures dynamiques.....	79
1. Anabolisme de la gouttelette lipidique	79
1.1. Anabolisme des PHA chez les procaryotes.....	79
1.2. Quelques remarques sur l'anabolisme des TAG, composant majeur des gouttelettes lipidiques chez les eucaryotes	80
2. Biogenèse de la gouttelette lipidique	81
2.1. Biogenèse des granules de PHA chez les procaryotes.....	81
2.2. Biogenèse des gouttelettes lipidiques riches en TAG chez les eucaryotes	83
3. Catabolisme de la gouttelette lipidique	88
3.1. Une régulation lipidique par la β -oxydation.....	88
3.2. Une régulation protéique par la machinerie ERAD et le protéasome 26S.....	90
3.3. Des exemples de régulation du catabolisme de la gouttelette lipidique	93
3.3.1. Chez les procaryotes producteur de PHA.....	93
3.3.2. Chez les <i>Mammalia</i> (<i>Opisthokonta</i>).....	94
3.3.2.1. La remobilisation des acides gras.....	94
3.3.2.2. Rôle spécifique de la machinerie ERAD.....	96
3.3.2.3. La lipophagie.....	97
3.3.3. Chez les organismes photosynthétiques.....	98
3.3.3.1. Les <i>Viridiplantae</i>	98
3.3.3.1.1. La lipolyse des graines oléagineuses	98
3.3.3.1.2. La lipophagie chez les plantes	101
3.3.3.2. Les <i>Heterokonta</i>	101

Partie 4 : Propriétés biophysiques de la gouttelette lipidique	104
1. Généralités	104
2. Contraintes biophysiques au cours de la biogenèse de la gouttelette lipidique	105
2.1. La nucléation de la gouttelette lipidique.....	105
2.2. La croissance de la gouttelette lipidique.....	108
2.2.1. Mécanisme de coalescence.....	108
2.2.2. Mécanisme de maturation d'Ostwald.....	109
2.3. Le bourgeonnement de la gouttelette lipidique.....	110
Objectifs du travail de thèse	113
Matériel & Méthodes	115
1. Organismes modèles et méthode de culture	117
1.1. La diatomée <i>Phaeodactylum tricornutum</i> Pt1.....	117
1.1.1. Souche Pt1 8.6.....	117
1.1.2. Méthodes générales de culture et mises en carence nutritionnelles.....	117
1.1.2.1. Milieu de culture ESAW.....	117
1.1.2.2. Méthodes et conditions de culture.....	117
1.1.2.3. Cryopréservation des souches d'études.....	117
1.1.3. Incubation en présence de composés chimiques.....	119
1.1.3.1. Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	119
1.1.3.2. Isoprostanoïdes.....	119
1.1.3.3. 17 α -éthynylestradiol.....	119
1.1.3.4. Epibrassinolide.....	120
1.1.3.5. <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal (DD).....	120
1.1.3.6. Z-VAD-FMK.....	120
1.2. <i>Escherichia coli</i> DH5 α	122
2. Méthodes de biologie moléculaire	122
2.1. Plasmides utilisés.....	122
2.1.1. Le plasmide PH4-AS_MCS-II.....	122
2.1.2. Le plasmide PH4-peGFPmono Zeo.....	123
2.2. Extraction et purification de l'ADN génomique.....	124
2.3. Méthodes de clonage.....	124
2.3.1. Constructions anti-sens.....	124
2.3.2. Clonage Gibson.....	125
2.4. Transformation de bactéries avec les produits de ligation et sélection des transformants.....	126
2.5. Transformation par biolistique de <i>Phaeodactylum</i>	128
2.6. Mesure de l'expression génique.....	129
2.6.1. Extraction et purification des ARN totaux.....	129
2.6.2. Transcription inverse.....	130
2.6.3. PCR quantitative.....	130
3. Analyses physiologiques	131
3.1. Concentration cellulaire.....	131
3.2. Chlorophylle.....	132
3.3. Mesure de la capacité photosynthétique.....	132
3.4. Détermination de la teneur en caroténoïdes.....	133
4. Méthodes d'étude des gouttelettes lipidiques	134
4.1. Marquage des gouttelettes lipidiques par le rouge de Nil.....	134
4.2. Fractionnement des gouttelettes lipidiques de <i>Phaeodactylum</i>	134
4.3. Détermination de la taille des gouttelettes lipidiques par RMN diffusionnelle.....	136
5. Méthodes d'étude des lipides	138
5.1. Extraction des glycérolipides selon la méthode de Folch.....	138

5.2. Extraction des glycérolipides selon la méthode de Bligh & Dyer	139
5.3. Quantification des extraits totaux par GC-FID ou GC-MS/FID	139
5.3.1. Méthanolyse des extraits totaux.....	139
5.3.2. Dosage par GC-FID ou GC-MS/FID.....	139
5.4. Quantification des glycérolipides	140
5.4.1. Séparation par TLC et dosage par GC-FID.....	140
5.4.2. Dosage des glycérolipides par LC-MS/MS.....	141
5.5. Extraction et quantification des oxylipines non-enzymatiques	142
5.6. Extraction et quantification des stérols esters	143
6. Méthodes d'étude des protéines	144
6.1. Extraction des protéines.....	144
6.2. Dosage des protéines	145
6.2.1. Méthode de Bradford.....	145
6.2.2. Coloration au nitrate d'argent.....	145
6.3. Immunodétection de protéines (Western Blot).....	146
6.3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	146
6.3.2. Transfert des protéines.....	146
6.3.3. Immunomarquage des protéines.....	146
6.3.4. Détection des protéines par <i>enhanced chemiluminescent</i> (ECL).....	147
6.4. Analyse protéomique par spectrométrie de masse	149
6.4.1. Digestion des protéines.....	149
6.4.2. Analyse des peptides par nano-LC-MS/MS.....	149
6.4.3. Recherche des fragments peptidiques dans les bases de données et traitement des résultats de spectrométrie de masse.....	150
7. Méthodes d'imagerie.....	151
7.1. Microscopie à épifluorescence.....	151
7.2. Microscopie confocale	151
7.3. Microscopie électronique à transmission	151
8. Analyses statistiques.....	152
Résultats.....	153
Chapitre 1: Induction de la synthèse de gouttelettes lipidiques par des petites molécules chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i>.....	155
1. Préambule	157
2. Article 1.....	158
3. Étude de l'effet de l'épibrassinolide sur le métabolisme de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>.....	185
3.1. Introduction	185
3.2. Effet physiologique de l'épibrassinolide sur <i>Phaeodactylum</i>	185
3.3. Conclusion et perspectives d'études	188
Chapitre 2: Réévaluation des effets du monoxyde d'azote chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i>.....	191
1. Préambule	193
2. Article 2.....	195
Chapitre 3 : Détection d'oxylipines non-enzymatiques chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en réponse à un stress oxydant.....	221
1. Préambule	223
2. Article 3.....	225
Chapitre 4 : Architecture de la gouttelette lipidique de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>... 243	243
1. Préambule	245
2. Article 4.....	247

Chapitre 5 : Étude fonctionnelle de la protéine CGI-58 chez <i>Phaeodactylum</i>	
<i>tricornutum</i>	273
1. Introduction	275
2. Mise en place de lignés anti-sens	275
2.1. Construction	275
2.2. Expression génique.....	276
3. Étude physiologiques des lignés anti-sens CGI-58-AS1, AS2 et AS5	278
3.1. Cultures en condition normale (ESAW 10N10P).....	278
3.2. Cultures en carence d'azote (ESAW 00N10P).....	280
4. Conclusion et perspectives d'études	282
Discussion Générale et Conclusion	285
1. Induction de la formation de gouttelettes lipidiques chez <i>Phaeodactylum</i>	287
2. Une architecture originale de la gouttelette lipidique	289
3. Biogenèse de la gouttelette lipidique chez <i>Phaeodactylum</i>	292
4. Des fonctionnalités peu explorées de la gouttelette lipidique	293
5. Relocalisation de la gouttelette lipidique vers la membrane plasmique ?	294
6. Conclusion	296
Données complémentaires : Élaboration d'un modèle mathématique déterministe de	
croissance des populations de gouttelettes lipidiques de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ...	297
1. Introduction	299
2. Résultats et discussion	299
2.1. Analyses physiologiques de <i>Phaeodactylum</i> en carence d'azote	299
2.2. Analyses lipidiques de <i>Phaeodactylum</i> en carence d'azote	300
2.3. Détermination de la taille de la gouttelette lipidique	302
3. Conclusion et perspectives	306
Références bibliographiques	307
Liste des productions scientifiques	340
Liste de participation à des conférences	342
Résumé	344

Table des Figures

Figure 1 : Isomérisation <i>Cis-Trans</i> des acides gras insaturés	3
Figure 2: Schéma de la stratégie de Recherche et Développement (R&D) pour la mise en place de filières algosourcées.....	7
Figure 3 : Nomenclature <i>sn</i> - (stereospecific number) du glycérol.....	8
Figure 4 : Structuration des glycérolipides membranaires en suspensions aqueuses.....	9
Figure 5 : Structures chimiques des bêtaine lipides identifiés chez les microalgues.	14
Figure 6 : Schéma général de l'architecture d'une gouttelette lipidique.....	16
Figure 7 : Phylogénie des <i>Chromista</i>	21
Figure 8 : Évolution des plastes primaires et secondaires.	23
Figure 9 : Lithographie illustrant la diversité morphologique des diatomées.....	24
Figure 10: Morphologie des diatomées centriques.....	25
Figure 11 : Morphologie des diatomées pennées	25
Figure 12 : Cycle de vie haplodiplophasique des Diatomées.....	26
Figure 13 : Origine géographique et principaux morphotypes des accessions de <i>Phaeodactylum</i>	28
Figure 14 : Méthodes générales d'édition des génomes.....	30
Figure 15 : Représentation schématique de la synthèse des acides gras chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	33
Figure 16 : Représentation schématique de la synthèse des acides gras et des VLC-PUFAs chez <i>Phaeodactylum</i>	34
Figure 17 : Voie de synthèse « procaryotique » des glycérolipides chloroplastiques	35
Figure 18 : Représentation schématique de la voie de synthèse de Kennedy.	37
Figure 19 : Un modèle impliquant la PC pour la synthèse de TAG.....	39
Figure 20 : Structure chimique des Polyhydroxyalcanoates (PHAs)	40
Figure 21 : Granules de PHB de <i>R. eutropha</i> H16.....	41
Figure 22 : Gouttelettes lipidiques de <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1.	44
Figure 23 : Conservation de l'architecture des périlipines de mammifères, <i>Drosophila</i> et <i>Dictyostelium</i>	49
Figure 24 : Structure des récepteurs nucléaires PPAR.....	51
Figure 25 : Endosymbioses primaires	63
Figure 26 : Représentations schématiques des structures de l'oléosine, de la caléosine et de la stéroléosine à la surface d'une gouttelette lipidique..	64
Figure 27 : Phylogénie non enracinée d'environ 600 oléosines provenant d'algues vertes, de plantes primitives et de Spermatophytes.	67
Figure 28 : Rôle de PUX10 à la surface des gouttelettes lipidiques du tube pollinique de <i>Nicotiana tabacum</i>	69
Figure 29 : Plusieurs événements d'endosymbioses secondaires.....	72
Figure 30 : Localisation de la StLDP à la surface de la gouttelette lipidique de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	76
Figure 31 : Voies de synthèse des granules de PHA chez les procaryotes.....	79
Figure 32 : Modèle de biogenèse des TAG chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	80
Figure 33 : Deux modèles pour la formation des granules de PHA chez les procaryotes.....	82
Figure 34 : Mécanisme général de biogenèse de la gouttelette lipidique chez les eucaryotes.	83
Figure 35 : Topologie de la protéine Seipin humaine.	84
Figure 36 : Mode d'action de la Seipin.....	86
Figure 37 : Formation du complexe ARF1/COP1 pour le transport vésiculaire rétrograde.....	88
Figure 38 : La β -oxydation peroxysomale et mitochondriale.....	90
Figure 39 : Mécanisme général d'ubiquitination.	91
Figure 40 : Mécanismes de contrôle de la qualité et de la quantité de protéines dans le réticulum endoplasmique (RE).....	92
Figure 41 : Un modèle de synthèse et de dégradation des granules de PHB de <i>R.eutropha</i> H16.....	94
.....	94
Figure 42 : Mécanisme de lipolyse dans les adipocytes des <i>Mammalia</i>	95

Figure 43 : Régulation du métabolisme des TAG par la machinerie ERAD.	97
Figure 44 : Mécanisme de lipophagie.....	98
Figure 45 : Ubiquitination des oléosines à la surface des graines oléagineuses lors de leur germination.....	100
Figure 46 : Mécanisme générale de la lipolyse chez les plantes.....	100
Figure 47 : Relations phylogénétiques entre la majorité des familles de protéines lipases basées sur leurs séquences d'acides aminés.....	103
Figure 48 : Propriétés biophysiques des tensioactifs à la surface de la gouttelette lipidique.....	104
Figure 49 : Nucléation d'une lentille de TAG (TG) au sein de la bicouche lipidique (PL) du réticulum endoplasmique.....	106
Figure 50 : La barrière énergétique de nucléation.....	106
Figure 51 : Mécanisme de coalescence.....	108
Figure 52 : Principe de la maturation d'Ostwald.	110
Figure 53 : Représentation schématique du bourgeonnement de la gouttelette selon un modèle de mouillage à trois phases..	111
Figure 54 : Carte du vecteur PH4-AS_MCS-II utilisé pour l'expression génique chez <i>Phaeodactylum</i>	123
Figure 55 : Carte du plasmide PH4-peGFPmono Zeo utilisé pour la localisation de protéines fluorescentes	123
Figure 56 : Principe du clonage Gibson.....	125
Figure 57 : Représentation schématique de la dissipation de chaleur	133
Figure 58 : Représentation schématique d'une purification de gouttelettes lipidiques de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	136
Figure 59 : Schéma expérimental appliqué pour la mesure des dimensions des gouttelettes lipidiques de <i>Phaeodactylum</i> par RMN diffusionnelle.....	137
Figure 60 : Séquence d'impulsions bipolaires appliquées pour déterminer le rayon des gouttelettes lipidiques.....	137
Figure 61 : Séparation par chromatographie sur couche mince des glycérolipides de <i>Phaeodactylum</i> Pt1.....	141
Figure 62 : Exemple de gamme étalon de BSA permettant de déterminer la concentration d'échantillons protéiques.....	145
Figure 63 : Homologie structurale entre le 17 α -éthynylestradiol et l'épibrassinolide.....	185
Figure 64 : Analyses physiologiques de <i>Phaeodactylum</i> en présence de doses croissantes d'épibrassinolide.....	186
Figure 65 : Profil des acides gras totaux de <i>Phaeodactylum</i> traité avec des doses croissantes d'épibrassinolide.....	187
Figure 66 : Profil des glycérolipides après un traitement avec l'épibrassinolide.....	189
Figure 67 : Schématisation de la construction de l'anti-sens CGI-58 chez <i>Phaeodactylum</i>	276
Figure 68 : Analyses de l'efficacité des primers de qPCR pour le gène cible CGI-58 (A) ainsi que pour les gènes de ménage H4 (B), HPRT (C) et RPS (D).....	277
Figure 69 : Expression génique des lignées transformées avec une construction anti-sens du gène de CGI-58 obtenues par biolistique	277
Figure 70 : Analyses physiologiques de lignées de <i>Phaeodactylum</i> sauvages (WT), transformées avec un vecteur « vide » (Empty vector) et des constructions anti-sens CGI-58 cultivées en conditions normales de croissance (ESAW 10N10P).....	278
Figure 71 : Profil des acides gras totaux de lignées de <i>Phaeodactylum</i> sauvages (WT), transformées avec un vecteur « vide » (Empty vector) et des constructions anti-sens CGI-58 (CGI-58-AS1 CGI-58-AS2 et CGI-58-AS5) cultivées en condition normale de croissance (ESAW 10N10P).....	279
Figure 72 : Analyses physiologiques de lignées de <i>Phaeodactylum</i> sauvages (WT), transformées avec un vecteur « vide » (Empty vector) et des constructions anti-sens CGI-58 (CGI-58-AS1, CGI-58-AS2 et CGI-58-AS5) cultivées en carence d'azote (ESAW 00N10P).....	280

Figure 73 : Profil des acides gras totaux de lignées de <i>Phaeodactylum</i> sauvages (WT), transformées avec un vecteur « vide » (Empty Vector) et des constructions anti-sens CGI-58 (CGI-58-AS1, CGI-58-AS2 en violet et CGI-58-AS5) cultivées en carence d'azote (ESAW 00N10P).....	281
Figure 74: Proposition d'un modèle architectural de la gouttelette lipidique de <i>Phaeodactylum</i>	290
Figure 75 : Analyses physiologiques de <i>Phaeodactylum tricorutum</i> en carence d'azote.....	300
Figure 76 : Analyses lipidiques de <i>Phaeodactylum</i> en carence d'azote	301
Figure 77 : Comparaison de la taille des gouttelettes lipidiques déterminée par microscopie à épifluorescence et par RMN diffusionnelle	302
Figure 78 : Suivi de la dynamique des gouttelettes lipidiques de <i>Phaeodactylum tricorutum</i> par imagerie confocale et évaluation de taille des rayons des gouttelettes lipidiques.....	303
Figure 79 : Représentations schématiques des hypothèses de biogenèse gouttelettes lipidiques à l'intérieur de <i>Phaeodactylum</i>	304

Table des Tableaux

Tableau 1 : Tableau synthétisant les principaux acides gras simples, saturés et insaturés.....	5
Tableau 2 : Précurseurs des glycérolipides chez les microalgues.....	10
Tableau 3 : Diversité moléculaire des têtes polaires des glycérolipides membranaires.....	12
Tableau 4 : Composition en acides gras des glycérolipides chloroplastiques de <i>Phaeodactylum</i> . ..	36
Tableau 5 : Évolution de la nomenclature des périlipines chez les mammifères	48
Tableau 6 : Synthèse des analyses protéomiques de la gouttelette lipidique chez des modèles de mammifères	53
Tableau 7 : Quelques exemples de maladies altérant le métabolisme des lipides chez les Mammifères	56
Tableau 8 : Composition du milieu ESAW 10N10P.....	118
Tableau 9: Isoprostanoïdes testés pour leurs effets possibles sur le phénotype de <i>Phaeodactylum</i> (Résultats - Chapitre 3).....	121
Tableau 10 : Primers utilisés pour la construction des lignées anti-sens du gène de CGI-58.....	125
Tableau 11 : Composition du mélange de réaction isotherme utilisé pour le clonage Gibson	126
Tableau 12 : Liste des primers utilisés pour valider les transformations	127
Tableau 13 : Liste des primers de qPCR utilisés	131
Tableau 14 : Synthèse des anticorps utilisés dans le cadre de cette thèse.....	148
Tableau 15 : Régulations du métabolisme des glycérolipides de <i>Phaeodactylum</i> observées dans cette thèse.....	288
Tableau 16 : Equations de biogenèse des trois populations de gouttelettes lipidiques de l'hypothèse trois	306

Liste des abbréviations

α -DOX : dioxygénases
 ΔP : pression de Laplace
 γ : tension de surface
 Γ : tension de ligne
AB : *alkenone body*
ABC : ATP binding cassette
ABCA1 : ATP binding cassette transporter A1
ABDH5 : α/β hydrolase domain-containing 5
AC : Avi-Chemix™
ACAA : acétyl-CoA acyltransférase
ACAT1 : acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransférase 1
ACCase : acétyl-CoA carboxylase
ACP : *acyl carrier protein*
ACS : acétyl-CoA synthétase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNg : ADN génomique
ADFP : adipophilin
ADP : adenosine triphosphate
ADRP : *adipose differentiation-related protein*
AGPAT2 : 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase 2
ALA : acide α -linoléique
AMP : adenosine monophosphate
ANOVA : analyse de variance
ANS : acide-8-anilino-1-naphtalène sulfonique
AOC : allene oxide cyclases
AOS : allene oxide synthases
AP : acide phosphatidique
ARA : acide arachidonique
ARF1 : ADP Ribosylation Factor 1
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASL : arginosuccinate lyase
ATGL : adipose triglycéride lipase
ATS1 : glycérol-3-phosphate acyltransférase 1
ATS2 : 1-acylglycérol-3-phosphate-acyltransférase
BAAR : bacille acido-alcool-résistant
BCG : bacille de Calmette et Guérin
BCSL2 : *Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy type 2*
BHT : hydroxytoluène butylé
BIP : ER luminal binding protein
BODIPY : bore-dipyrométhène
BSA : serum albumine bovine
BTA-like : betaine lipid synthase-like
 $C\omega$: carbone oméga
CACT carnitine-acylcarnitine translocase
CAV1 : caveolin-1
CCAP : *Culture Collection of Algae and Protozoa*
CCT1 : CTP:phosphocholine cytidyltransférase 1
CDC48 : *Cell Division Cycle 48*
CDP : cytidine diphosphate
CDP-DAG : cytidine diphosphate diacylglycérol
CDP-DAGS : cytidine diphosphate diacylglycérol synthase
CE : corps élémentaire
CGI-58 : comparative gene identification-58

CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CIDEF : *cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector c*
CLO : caléosines
CMBA : plateforme de criblage pour des molécules bioactives
CR : corps réticulé
CRISPR/Cas9 : *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*
CO₂ : dioxyde de carbone
CoA : coenzyme A
COP : *coat protein* ou *coatomer*
COX : cyclooxygénases
CPTs : *carnitine palmitoyltransférases*
CTP : cytidine triphosphate
DAG : diacylglycerol
dATP : désoxyadénosine triphosphate
DBD : *domain binding DNA*
dCTP : désoxycytidine triphosphate
DD : *trans,trans-2,4-decadienal*
DENV : virus de la dengue
DGAT : diacylglycérol acyltransférase
DGCC : 1,2-diacylglyceryl-3-O-carboxy-(hydroxyméthyl)-choline
DGD : digalactosyldiacylglycérol synthase
DGDG : digalactosyldiacylglycérol
DGTA : diacylglycérylhydroxyméthyltriméthyl-β-alanine
DGTS : diacylglycéryltriméthylhomosérine
DHA : acide docosahexaénoïque
DMPE : diméthylphosphatidyléthanolamine
DMSO : diméthylsulfoxyde
DOAP1 : diatom-oleosome-associated-protein 1
DPA : acide docosapentaénoïque
DPG : diphosphatidylglycérol
DSB : *double-strand break*
DTT : dithiothréitol
dTTP : désoxythymidine triphosphate
ECH : enoyl-CoA hydratase
ELC : *enhanced chemiluminescent*
EDTA : éthylènediaminetétraacétique
eGFP : *enhanced Green Fluorescent Protein*
eLD : gouttelettes lipidiques en expansion
EPA : acide eicosapentaénoïque
ER : enoyl-ACP réductase
ERAD : *Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation*
ESAW : *Enrichment Solution with Artificial Water*
ESI : *electrospray ionisation*
FA : acides gras
FA-CoA : acide gras-coenzyme A
FAD : flavine adenine dinucléotide
FAS : *fatty acid synthase*
FFA : acides gras libres
FIT2 : fat-inducing transcript
FSP27 : fat-Specific-Protein of 27 kDa
Fv/Fm : capacité photosynthétique du photosystème II
G0S2 : G0/G1 switch protein 2
G3P : glycérol-3-phosphate
GBF1 : golgi-specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor
GC-FID : chromatographie gazeuse couplée à une détection à ionisation de flamme

GC-MS/FID : chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse et à une détection à ionisation de flamme
GEF : *guanine nucleotide exchange factor*
GFP : *green fluorescent protein*
GMPc : guanosine monophosphate cyclique
GOGAT : *glutamine oxoglutarate aminotransferase*
Gp78 : *glycoprotein 78*
GPAT : glycérol-*sn*-3-phosphate acyltransférase
gRNA : ARN guide
GS : glutamine ynthase
GTP : guanosine triphosphate
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
H4 : histone H4
HA : hydroxy-acides
HAD : hydroxyacyl-ACP-réductase
HADH : hydroxyacyl-CoA-deshydrogénase
HDEL : peptide signal Histine – Acide Aspartique – Acide Glutamique - Leucine
HDR : homology directed repair
HI : phase hexagonale I
HII : phase hexagonale II
HOGP : *Haematococcus Oil Globule Protein*
HPLC : *High Pressure Liquid Chromatography*
HPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HRP : *horseradish peroxydase*
HSD : hydroxystéroïde déshydrogénase
HSL : hormone-Sensitive-Lipase
HSP : *heat Shock Proteins*
iBAQ : *intensity-based absolute quantification*
iLD : gouttelettes lipidiques initiales
IsoPs : Isoprostanes
JA : acide jasmonique
K48Ub₂ : K48-linked diubiquitine
K63Ub₂ : K63-linked diubiquitine
KAR : 3-ketoacyl-ACP-réductase, NADPH-dépendante
KASI : ketoacyl-ACP synthase I
KASII : ketoacyl-ACP synthase II
KASIII : β-ketoacyl-ACP synthase III
KD : *knock-down*
kDa : kilo Dalton
KDEL : peptide signal Lysine – Acide Aspartique – Acide Glutamique – Leucine
KDELRL : récepteur du peptide signal Lysine – Acide Aspartique – Acide Glutamique – Leucine
KO : *knock-out*
LAL : lipase acide lysosomale
LB : *Lysogeny Broth*
LBD : *Ligand binding domain*
LCFA : acides gras à chaînes longues
LC-PUFA : acides gras poly-insaturés à longues chaînes
LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem
LD : *lipid droplet* ou gouttelette lipidique
LDAP : *lipid droplet associated proteins*
LDL : *low density lipoproteins*
LDSP : *lipid droplet surface protein*
LIPA : lipase A
Log P : coefficient de partage octanol-eau
LOX : lipoxygénases

LPA : acide lyso-phosphatidique
LPAAT : lysophosphatidate acyltransférase
LPCAT : acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransférase
Lsdsh1 : *lipid droplet subset deshydrogenase 1*
LXR- α : *liver X receptor α*
LPC / Lyso-PC : lysophosphatidylcholine
LPE : lysophosphatidyléthanolamine
MAG : monoacylglycérol
MALDI : *matrix-assisted laser desorption/ionization*
MCAT : malonyl-CoA : acyl-carrier protein transacylase
MCFA : acides gras à chaînes moyennes
MDH : monodansylpentane
MGD : monogalactosyldiacylglycérol synthase
MGDG : monogalactosyldiacylglycérol
MGL : monoglycéride lipase
MLDP : *major lipid droplet protein*
MLDS : *microorganism lipid droplet small*
MLDSR : *microorganism lipid droplet small regulator*
MRM : *multiple reaction mode*
MUFA : acides gras mono-insaturés
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NCMA : *National Center for Marine Algae and Microbiota*
NeuroPs : neuroprostanes
NHEJ : *non-homologous end joining*
NIR : ferredoxin-nitrite reductase plastidiale
NO : monoxyde d'azote
NOLD : *non-oleosin based lipid droplets*
NOS : NO synthase
NPQ : *non-photochemical quenching*
NR : *nitrite reductase*
NS5A : nonstructural protein 5A
OH \cdot : radicaux libres
OLD : *oleosin-based lipid droplets*
OLE : oléosines
PAM : *protospacer adjacent motif*
PAP : phosphatidate phosphatase
PAP/Fibrillin : plastid-lipid associated protein, Fibrillin
PAT : Perilipin - Adipophilin – Tail-interacting protein of 47 KDa
PC : phosphatidylcholine
PCR : réaction en chaîne par polymérase
PDAT : phospholipid:diacylglycérol acyltransférase
PDCT : phosphatidylcholine:diacylglycérol choline phosphotransférase
PDE : phosphodiéstérases
PDH : pyruvate deshydrogénase
PE : phosphatidyléthanolamine
PEG-8000 : polyéthylène glycol
PFG NMR : *Pulse Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance*
PG : phosphatidylglycérol
PGD1 : plastid galactolipid degradation 1 protein
PGPS : phosphatidylglycérol-phosphate synthase
PHA : polyhydroxyalcanoate
PhaA : β -kétothiolase
PhaB : acétoacétyl-CoA réductase
PhaC : PHA/PHB synthase
PhaP : phasine
PhaR : répresseurs transcriptionnels de la Phasine

PhaY : PHB hydrolases
PhaZ : PHA/PHB dépolymérase
PHB : poly(3-hydroxybutyrate)
PHV : polyhydroxyvalérate
PhytoPs : phytostanols
PI : phosphatidylinositol
PKA : protéine kinase A
PL : phospholipides
PLA2 : phospholipase A2
PLIN : périlipine
PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyl
PNPLA2 : *patatin-like phospholipase domain containing 2*
PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*
PPi : pyrophosphate
PPRE : *Peroxisome Proliferator Response Element*
PS : phosphatidylsérine
Psp A : phage shock protein A
PUFA : acides gras polyinsaturés
PUX10 : *plant UBX Domain-containing Protein 10*
PV : poliovirus
PXA1 : *peroxysomal ABC-transporter 1*
QC : contrôle qualité
RE : réticulum endoplasmique
REF : *rubber elongation factor*
RFP : *red fluorescent protein*
RMN : résonance magnétique nucléaire
RNAi : interférence par ARN
RPS : *ribosomal protein S1*
RV : rotavirus
RXR : récepteur X du rénoïde nucléaire
SCFA : acides gras à chaînes courtes
SDS : dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
Ser : sérine
SDP1 : sugar dependent 1
SDP1-L : *SDP1-like*
SLDP : *Symbiodinium lipid droplet protein*
sn- : nomenclature *stereospecific number*
SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein*
SPDS : *spermidine synthase 1*
SPE : extraction en phase solide
SPFH : *Stomatins, Prohibitins, Flotillins and Hflk/C domain*
SQD1 : UDP-sulfoquinovose synthase
SQD2 : UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransférase
SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol
SREBP : *Sterol regulatory element-binding protein*
SRP1 : *small rubber protein1*
SRPP : small Rubber particle protein
StLDP : *Stramenopile lipid droplet protein*
TAG / TG : triacylglycérol
TALE : *transcription activator-like effector*
TALEN : *Transcription-Activator-Like-Effector Nuclease*
TBS : tris-buffered saline
TE : thioestérase
TGL : TAG lipases

TIP47 : *tail-interacting protein of 47 kDa*
TLC : *thin layer chromatography*
TLDP1 : *Thraustochytrid-specific lipid droplet protein 1*
Tm : température d'hybridation
TNF- α : facteur de nécrose tumorale
TOF : *time of flight*
UBAC2 : *UBA domain-containing protein 2*
Ub : monoubiquitine
UBDX8 : *UBX domain-containing protein 8*
UDP : uridine diphosphate
UDPG : UDP-glucose pyrophosphorylate
uFA : acide gras insaturé
UPS : ubiquitine-Protéasome 26S
US-FDA : agence américaine des produits alimentaires et des médicaments
UTP : uridine triphosphate
V-ATPase : vacuolar-type H⁺-ATPase
VCP : valosin-containing-protein
VHC : virus de l'hépatite C
VLC-FA : acides gras à très longues chaînes
VLC-PUFA : acides gras poly-insaturés à très longues chaînes
VLDL : *very low density lipoproteins*
VP : vacuole parasitophore
WT : *wild-type*
YFP : *yellow fluorescent protein*
ZFN : nucléase à doigt de zinc
Z-VAD-FMK : carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone

Introduction Générale

1. Généralité sur les glycérolipides

Les lipides sont des molécules hydrophobes ou amphiphiles constituant les corps gras des êtres vivants, avec une densité inférieure à celle de l'eau et pour parties, non miscibles dans l'eau. Les lipides sont caractérisés par leurs propriétés physiques générales à la différence des autres macromolécules qui sont définies par leurs structures chimiques (polypeptides, acides nucléiques et polysaccharides). Ils présentent notamment un haut degré de diversité structurale (glycérolipides, stérols, isoprénoïdes,...). Les glycérolipides, constitués d'un squelette glycérol estérifié à des acides gras et porteurs ou non d'une tête polaire sont des constituants majeurs des membranes biologiques et des gouttelettes lipidiques.

1.1. Les acides gras

1.1.1. Définition

Les acides gras sont des acides carboxyliques possédant une chaîne aliphatique de longueur variable, généralement de nombre pair (de 8 à 30 carbones) (Lupette & Maréchal, 2018). Il existe des acides gras à nombre impair de carbones chez certains organismes *e.g.* *Auranthiochytrium* (Dellero et al., 2018). Les acides gras sont impliqués dans des fonctions vitales parmi lesquelles la structuration des membranes lorsqu'ils composent les glycérolipides ou les sphingolipides, le métabolisme énergétique ou encore la signalisation cellulaire, en particulier lorsqu'ils sont oxydés sous forme d'oxylipines.

1.1.2. Nomenclature des acides gras

La chaîne carbonée est dite saturée lorsqu'il n'y a pas de double liaison carbone-carbone, et insaturée lorsqu'il y a une (mono-) ou plusieurs liaison(s) (poly-insaturés). L'introduction d'une double liaison pour les acides gras insaturés introduit une isomérisation *cis-trans* (**Figure 1**). Cette isomérisation va notamment modifier la fluidité des membranes en instaurant des courbures au niveau des insaturations.

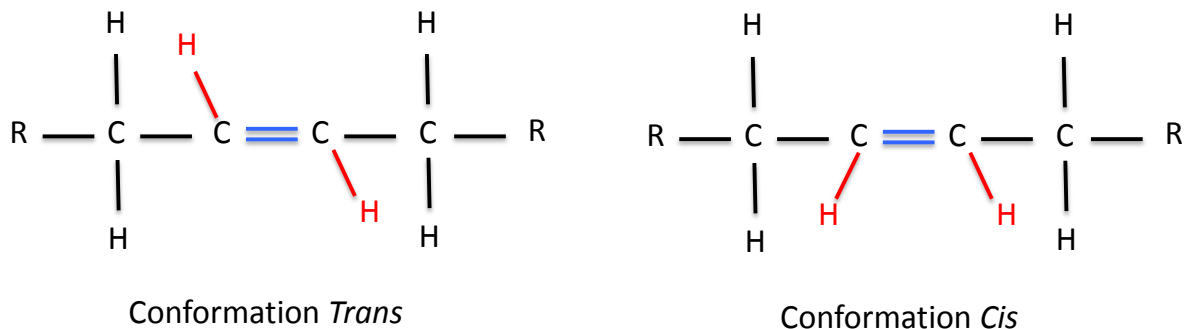


Figure 1 : Isomérisation *Cis-Trans* des acides gras insaturés. L'insaturation ou double liaison C-C est indiquée en bleue.

Une nomenclature existe selon la longueur et l'insaturation de la chaîne carbonée :

- SCFA et MCFA : les acides gras à chaînes courtes (*Short Chain Fatty Acid*) et à chaînes moyennes (*Medium Chain Fatty Acid*) sont des acides gras dont la chaîne carbonée est inférieure à 16 carbones et ne présentant pas d'insaturation.
- LCFA : les acides gras à chaînes longues (*Long Chain Fatty Acid*) ont une chaîne carbonée de 16 à 18 carbones, sans insaturation.
- VLCFA : les acides gras à très longues chaînes (*Very Long Chain Fatty Acid*) ont une chaîne carbonée supérieure à 20 carbones, sans insaturation.
- MUFA : les acides gras mono-insaturés (*Monounsaturated Fatty Acid*) présentent une seule insaturation.
- LC-PUFA : les acides gras poly-insaturés à longues chaînes (*Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid*) possèdent plusieurs doubles liaisons sur une chaîne carbonée comprise entre 16 et 18 carbones.
- VLC-PUFA : les acides gras poly-insaturés à très longues chaînes (*Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid*) ont une chaîne carbonée de longueur supérieure à 20 carbones et possèdent plusieurs insaturations


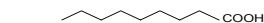




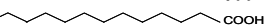

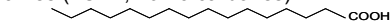
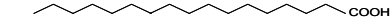


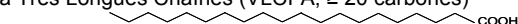
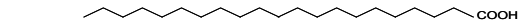

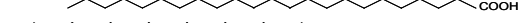

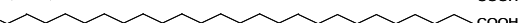
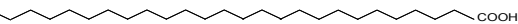
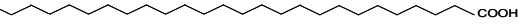



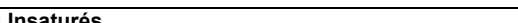
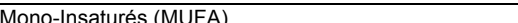













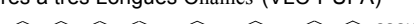



Trois types de nomenclatures existent pour dénommer un acide gras (**Tableau 1**) :

- une nomenclature systématique provenant de la stéréochimie de la structure de l'acide gras (Ex : Acide hétéradécanoïque)
- Une nomenclature vernaculaire (Ex : Acide palmitique)
- Une abréviation numérique de type X:Y (avec X, le nombre de carbones et Y, le nombre d'insaturations => 16:0 signifie un acide gras à 16 carbones et sans insaturation).

1.1.3. Intérêts biotechnologiques des acides gras chez les microalgues

Les acides gras constituent une partie des glycérolipides présentant un intérêt biotechnologique. En effet, les acides gras peuvent être utilisés pour une large gamme d'applications comme la nutrition, la santé et la cosmétique (VLC-PUFAs comme l'acide docosahéanoïque, DHA et l'acide eicosapentaéanoïque, EPA), les biocarburants et la chimie verte (acides gras saturés à courte chaîne) (**Figure 2**) (Lupette & Maréchal, 2018).

Introduction Générale

	Nomenclature Systématique	Nom Commun	Abréviation Numérique
Acides Gras Saturés			
Acide gras à Courtes et Moyennes Chaînes (SCFA and MCFA; <14-15 carbones)			
	octanoïque	caprylique	8:0
	nonanoïque		9:0
	décanoïque	caprique	10:0
	undécanoïque		11:0
	dodécanoïque	laurique	12:0
	tridécanoïque		13:0
	tétradécanoïque	myristique	14:0
	pentadécanoïque		15:0
Acides Gras à Longues Chaînes (LCFA; 16-19 carbones)			
	hexadécanoïque	palmitique	16:0
	heptadécanoïque	margarique	17:0
	octadécanoïque	stéarique	18:0
	nonadécanoïque		19:0
Acides Gras à Très Longues Chaînes (VLCFA; ≥ 20 carbones)			
	eicosanoïque	arachidique	20:0
	hénéicosanoïque		21:0
	docosanoïque	béhénique	22:0
	tricosanoïque		23:0
	tétracosanoïque	lignocérique	24:0
	pentacosanoïque		25:0
	hexacosanoïque		26:0
	heptacosanoïque		27:0
	octacosanoïque		28:0
	nonacosanoïque		29:0
	triacontanoïque		30:0
	hentriacontanoïque		31:0
	dotriacontanoïque		32:0
Acides Gras Insaturés			
Acides Gras Mono-Insaturés (MUFA)			
	[ω7-] or <i>cis</i> -9-hexadécénoïque	delta-9 palmitoléique (Graisse de baleine)	16:1 ⁹
	[ω9-] or <i>cis</i> -7-hexadécénoïque	≠ delta-7 palmitoléique (Lipides de plantes)	16:1 ⁷
	<i>trans</i> -3-hexadécénoïque	≠ trans-3 palmitoléique (groupement acyl du PG chez les plantes)	16:1t
Acides Gras à Longues Chaînes Poly-Insaturés (LC-PUFA)			
	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-hexadécadiénoïque		16:2 ^{9,12}
	<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10-hexadécadiénoïque		16:2 ^{7,10}
	<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-hexadécatriénoïque		16:3 ^{6,9,12}
	<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13-hexadécatriénoïque		16:3 ^{7,10,13}
	<i>cis</i> -4, <i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13-hexadécatétraénoïque		16:4 ^{4,7,10,13}
	<i>cis</i> -9-octadécénoïque	Oléique	18:1 ⁹
	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-octadécadiénoïque	Linoléique	18:2 ^{9,12}
	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-octadécatriénoïque	α-linolénique (ALA)	18:3 ^{9,12,15}
	<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-octadécatriénoïque	γ-linolénique (GLA)	18:3 ^{6,9,12}
	<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-octadécatriénoïque	stéaridonique	18:4 ^{6,9,12,15}
Acides Gras Poly-insaturés à très Longues Chaînes (VLC-PUFA)			
	<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11-eicosatriénoïque	acide de Mead	20:3Δ ^{5,8,11}
	<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14-eicosatétraénoïque	arachidonique (ARA)	20:4Δ ^{5,8,11,14}
	<i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14, <i>cis</i> -17-eicosatétraénoïque		20:4Δ ^{8,11,14,17}
	<i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14, <i>cis</i> -17-eicosapentaénoïque	eicosapentaénoïque (EPA)	20:5Δ ^{5,8,11,14,17}

Introduction Générale


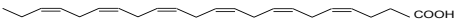

	<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19	docosapentaénoïque (DPA) or clupanodonique	22:5 Δ ^{7,10,13,16,19}
	<i>cis</i> -4, <i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19	docosahexaénoïque (DHA)	22:6 Δ ^{4,7,10,13,16,19}
	<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15, <i>cis</i> -18, <i>cis</i> -21	nisinique	24:6 Δ ^{6,9,12,15,17,21}

Tableau 1 : Tableau synthétisant les principaux acides gras simples, saturés et insaturés. L'abréviation numérique indique, pour le premier chiffre, la longueur de la chaîne carbonée, et pour le second chiffre, le nombre d'insaturations ou de doubles liaisons (Modifié d'après Lupette & Maréchal, 2018).

Concernant l'exploitation des acides gras, la valeur économique des microalgues s'appuie essentiellement sur les triacylglycérols ou TAGs (cf. Point 1.2). Une première étape consiste à sélectionner les microalgues intéressantes capables d'accumuler des TAGs sous forme de lipides de réserve. Pour cela, la biodiversité du phytoplancton (ensemble des espèces du plancton autotrophes vis-à-vis du carbone) est évaluée afin d'identifier des espèces d'intérêt. Les acides gras composant les molécules de TAGs présentent une grande diversité chimique, déterminée génétiquement par la présence d'un équipement enzymatique spécifique (Dolch & Maréchal, 2015), et aussi par des processus adaptatifs et/ou d'acclimatation en réponse aux facteurs environnementaux tels que la température (Pittera et al., 2018).

Les acides gras à courtes chaînes et sans double liaison présentent le plus haut potentiel pour la production de biocarburants (Chisti, 2007, Klein-Marcuschamer et al., 2013, Chisti, 2013). L'exploitation des énergies fossiles relargue du dioxyde de carbone (CO₂) piégé aux temps géologiques et contribue donc au réchauffement global. L'épuisement des réserves mondiales est difficile à prédire mais doit être anticipé. Ces deux raisons majeures justifient la recherche de ressources alternatives, durables et avec un impact environnemental maîtrisé. Plusieurs « générations » de biocarburants ont été définies. La première génération est développée à partir de cultures agricoles oléagineuses permettant la production de biodiésels (par transestérification de l'huile de colza, de l'huile du tournesol ou du palmier à huile) ou de plantes riches en sucres permettant la production de bioéthanol (par la fermentation des sucres du maïs, du blé, de la betterave ou de la canne à sucre). Cette première génération de biocarburants utilise des terres arables et se place en concurrence directe de la production de nourriture (de Cara et al., 2012, Maréchal, 2018a). Une deuxième génération de biocarburant provenant des déchets lignocellulosiques (non-alimentaires) s'est mise en place. Ces déchets lignocellulosiques sont abondamment disponibles et correspondent à des résidus agricoles (paille) et forestiers (chute de bois) transformés par exemple par voie thermo-chimique (gazéification) en hydrocarbures ou par voie biochimique (hydrolyse enzymatique) en bioéthanol (Didderen et al., 2009). Une troisième génération est proposée à partir des microorganismes, dont les microalgues pouvant accumuler de fortes

quantités de TAGs (Chisti, 2007). Les esters méthylés d'acides gras sont libérés des molécules de TAGs par une réaction de transestérification. De par leur facilité de culture, leur vitesse de croissance et leur productivité supérieure à celle des plantes terrestres, les microalgues constituent un modèle intéressant. Cependant, ces biocarburants de troisième génération ne sont toujours pas entrés en phase d'exploitation. Des défis majeurs consistent à développer une souche de microalgue capable d'accumuler de grandes quantités d'acides gras saturés dans les TAGs, notamment par des processus d'ingénierie génétique, et avec un rendement économiquement viable (Lupette & Maréchal, 2018). D'autres innovations sont aussi nécessaires au niveau des procédés de culture, des procédés de récolte et d'extraction et de l'intégration au sein de filières industrielles algo-sourcées (**Figure 2**).

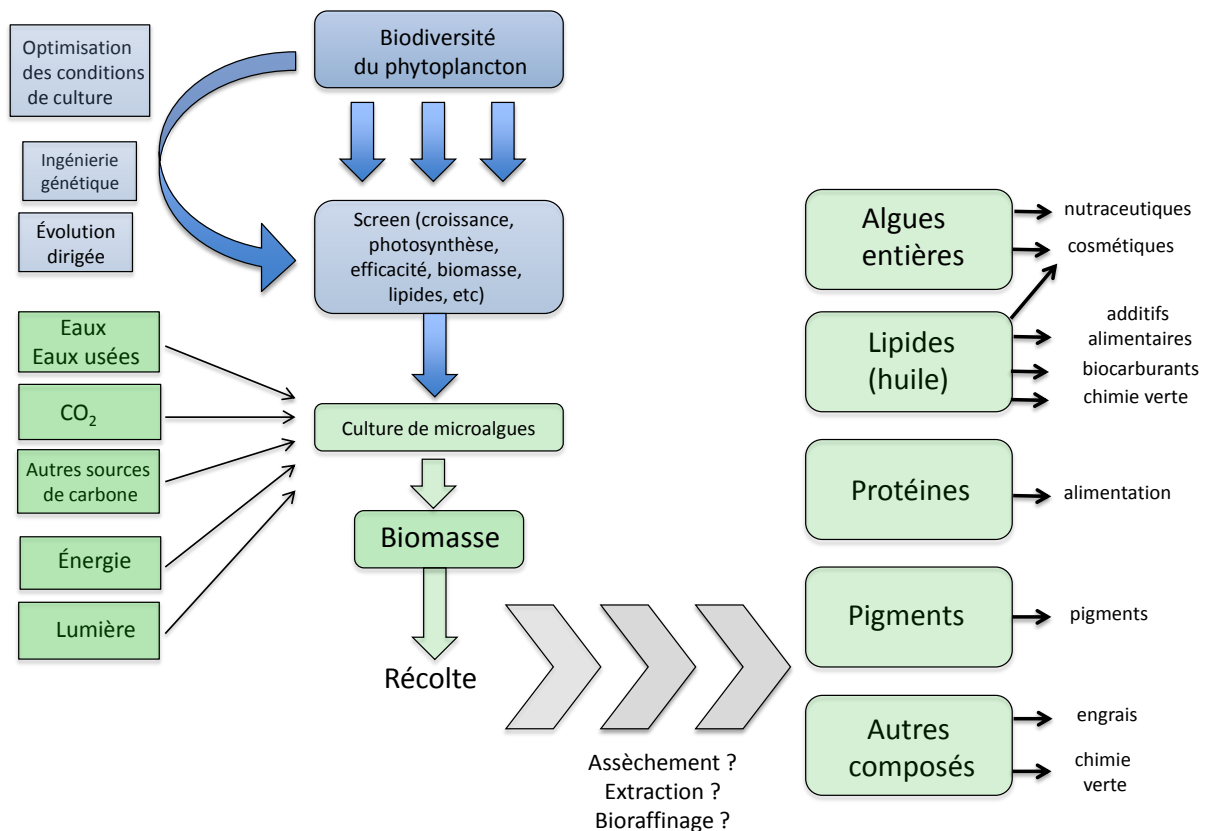


Figure 2: Schéma de la stratégie de Recherche et Développement (R&D) pour la mise en place de filières algosourcées. Les microalgues sont sélectionnées à partir de la biodiversité du phytoplancton. Leur croissance doit être optimisée et contrôlée dans divers systèmes tels que des bassins ouverts, des photobioréacteurs, etc. Certaines microalgues peuvent être améliorées par génie génétique ou évolution dirigée. La conception de systèmes de culture à grande échelle nécessite des approvisionnements en eau (provenant de sources naturelles ou idéalement des eaux urbaines ou industrialisées), du CO₂ (issu des émissions industrielles), ainsi que d'autres sources de carbone, de phosphore et d'azote, de lumière, d'énergie, etc. Le processus d'extraction des biomolécules est l'un des défis les plus importants pour l'avenir afin d'exploiter tous les sous-produits possibles, de devenir économiquement viable à long terme et de respecter les critères de durabilité (Modifié d'après Lupette & Maréchal, 2018).

Les acides gras à longues chaînes polyinsaturés (VLC-PUFA) présentent une valeur ajoutée pour des applications en nutrition animale (pisciculture) et en santé humaine (Pulz & Gross, 2004, Rosenberg et al., 2008, Ruiz et al., 2016, da Costa et al., 2016). Les microalgues sont notamment capables de produire l'ARA, l'EPA, ou le DHA (**Tableau 1**). Des acides gras polyinsaturés sont dits oméga-3 lorsque la première double liaison comptée à partir du C ω est en position 3 (exemples : EPA et DHA) alors que les oméga-6 présentent une première double liaison en position 6 à partir du C ω (exemple : ARA). Bien que l'humain soit capable de les synthétiser, la quantité produite est trop faible pour faire face aux besoins liés au développement embryonnaire, aux besoins physiologiques, et comme précurseurs majeurs d'hormones et de molécules signal (eicosanoïdes, prostaglandines, thromboxanes, etc.) (Simopoulos, 2009). Les apports nutritifs proviennent essentiellement de poissons (hareng, saumon, sardine, maquereau), et indirectement de la production primaire par les microalgues.

1.2. Les glycérolipides

1.2.1. Définition, nomenclature et propriétés physiques

L'équipe « Biogénèse, Dynamique et Homéostasie des lipides membranaires dans la cellule végétale » du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale de Grenoble s'intéresse particulièrement aux glycérolipides produits par les organismes photosynthétiques. Les glycérolipides sont des esters d'acide gras et de glycérol. Le glycérol constitue le squelette général des glycérolipides. Les carbones du squelette glycérol sont numérotés selon la nomenclature « stereospecific numbering » (*sn-1*, *sn-2* et *sn-3*) (**Figure 3**).

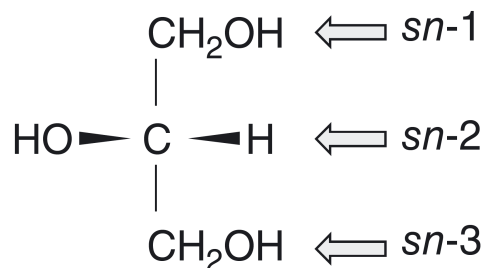


Figure 3 : Nomenclature *sn-* (stereospecific number) du glycérol, un tri-alcool formant le squelette universel des glycérolipides.

Les glycérolipides sont des lipides polaires, c'est-à-dire amphiphiles (une partie hydrophile et une partie hydrophobe). Les glycérolipides membranaires possèdent un à deux acides gras hydrophobes (formant une « queue hydrophobe ») en position *sn-1* et *sn-2* et une tête polaire hydrophile en position *sn-3*. Les triacylglycérols (TAGs) ne possèdent pas de tête polaire, mais un troisième acide gras hydrophobe.

Introduction Générale

Chaque glycérolipide présente des propriétés biophysiques particulières. La dispersion des glycérolipides en milieu aqueux peut former des bicouches lipidiques (phase lamellaire) ou des structures hexagonales inversées (phase hexagonale II, ou HII) ou non inversées (phase hexagonale I, ou HI) (Figure 4). Cette différence de dispersion dépend notamment du rapport de taille entre la tête polaire et le squelette diacylglycérol hydrophobe (Jouhet, 2013).

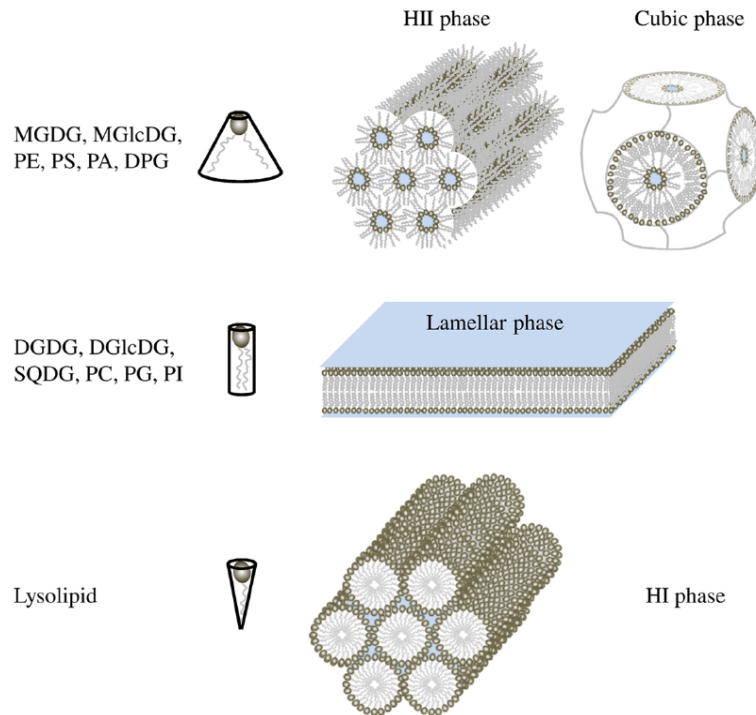


Figure 4 : Structuration des glycérolipides membranaires en suspensions aqueuses. Les lipides avec une « petite » tête polaire ont une forme moléculaire ressemblant à un cône tronqué. Ils induisent une tension de courbure négative et favorisent une organisation en micelles inversées (phases HII) ou en structures cubiques. Les lipides avec une tête polaire volumineuse ou ne contenant qu'un seul acide gras (lysolipides) présentent une forme moléculaire similaire à un cône inversé et induisent une courbure positive dans les membranes. Ils favorisent la formation de micelles tubulaires (phase hexagonale I ou HI) ou sphériques. Les lipides ayant des sections transversales similaires pour la tête polaire et la région hydrophobe ont une forme cylindrique. Ils forment des phases lamellaires, sans courbure (D'après Jouhet, 2013).

1.2.2. Les précurseurs des glycérolipides

L'ensemble des glycérolipides est synthétisé à partir de trois précurseurs : l'acide phosphatidique (AP), le diacylglycérol (DAG) et le cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG) (**Tableau 2**) (Boudière et al., 2014).

L'AP est synthétisé à partir de glycérol-3-phosphate et d'acide gras. L'acide phosphatidique constitue le précurseur direct ou indirect de tous les glycérolipides membranaires mais également des triacylglycérols (TAGs). De plus, l'AP est un messager intracellulaire dans de nombreux contextes cellulaires (Dubost et al., 2012).

Le DAG est synthétisé par la déphosphorylation de l'AP catalysée par une activité phosphatidic acid phosphatase (PAP). Le DAG constitue le précurseur de la phosphatidyléthanolamine (PE) et de la phosphatidylcholine (PC), des glycérolipides (MGDG, DGDG, SQDG) ainsi que des TAGs sous forme de gouttelettes lipidiques. Tout comme l'AP, le DAG peut-être un messager intracellulaire (Pejchar et al., 2010).

Le CDP-DAG est un liponucléotide synthétisé à partir de l'AP. Le CDP-DAG est le précurseur du phosphatidylglycérol (PG) dans les plastes, *via* la voie dite « procaryotique » (Andrews & Mudd, 1985). Le CDP-DAG est également le précurseur du phosphatidylinositol (PI), de la phosphatidylsérine (PS), et du PG « eucaryotique » dans le réticulum endoplasmique (Dubots et al., 2012).

Nom	Structure	Fonctions connues chez les eucaryotes
Acide Phosphatidique (AP)		<ul style="list-style-type: none"> - Précurseur le plus en amont pour les glycérolipides membranaires et le triacylglycérol, <i>via</i> le DAG ou le CDP-DAG - Messager intracellulaire.
Diacylglycérol (DAG)		<ul style="list-style-type: none"> - Précurseurs pour la synthèse des glycérolipides phosphatés (PE, PC) ou des glycérolipides non phosphatés (MGDG, DGDG, SQDG). - Messager intracellulaire.
Cytidine diphosphate diacylglycerol (CDP-DAG)		<ul style="list-style-type: none"> -Précurseur pour la synthèse de phospholipides (PS, PE, PC, PG, DPG).

Tableau 2 : Précurseurs des glycérolipides chez les microalgues (Modifié d'après Lupette & Maréchal, 2018)

1.2.3. Les phosphoglycérolipides

La tête polaire des phosphoglycérolipides contient un ou plusieurs groupements phosphate PO_4^{3-} . Les glycérolipides sont généralement classés en fonction de la charge de leur tête polaire (**Tableau 3**) : non chargé, anionique, cationique ou zwitterionique (une charge électrique formelle d'une unité de signe opposée située sur des atomes adjacents). Ci-dessous, une présentation succincte des différents phosphoglycérolipides rencontrés chez les microalgues est donnée.

La phosphatidyléthanolamine (PE) constitue également un des principaux lipides du réticulum endoplasmique. La PE forme des structures hexagonales II (Jouhet, 2013). La PE est synthétisée à partir de DAG ou de CDP-DAG et constitue également un précurseur important pour la synthèse de la PC. PC et PE présentent une tête polaire zwitterionique (**Tableau 3**).

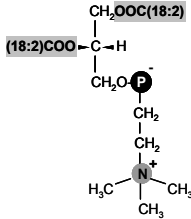
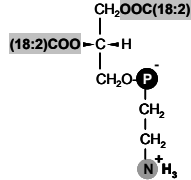
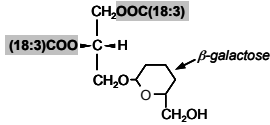
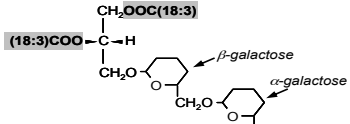
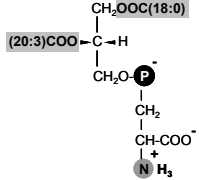
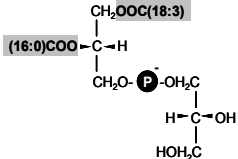
Les phosphoglycérolipides présentant une tête polaire anionique sont la phosphatidylsérine (PS), le PG, le diphosphatidylglycérol (DPG) et le phosphatidylinositol (PI). PS, PG et PI présentent une forme lamellaire alors que le DPG présent dans la mitochondrie peut former une phase hexagonale II (Jouhet, 2013). Chez les plantes supérieures, la PS est distribuée de façon asymétrique dans la membrane plasmique. La localisation de la PS n'a pas été étudiée chez les microalgues. Le PG constitue le précurseur du DPG dans la mitochondrie (Dubots et al., 2012). Le DPG n'a pas été détecté chez la diatomée *Phaeodactylum* (Abida et al., 2015). Il est également présent dans le chloroplaste et dans le réticulum endoplasmique.

1.2.4. Les glycolipides

Les glycolipides incluent les galactolipides (MGDG, DGDG) et les sulfolipides (SQDG). Ils forment avec le PG un quartet MGDG/DGDG/PG/SQDG conservé dans l'ensemble des membranes photosynthétiques des cyanobactéries aux endosymbiontes primaires et secondaires (Boudière et al., 2014, Petroutsos et al., 2014). Les plastes primaires sont limités par une enveloppe constituée de deux membranes alors que les plastes secondaires peuvent être limités par trois ou quatre membranes (Petroutsos et al., 2014 et données bibliographiques).

Le *sn*-1,2-diacyl-3-O- β -D-galactopyranosyl-*sn*-glycérol (monogalactosyldiacylglycérol ou MGDG) et le *sn*-1,2-diacyl-3-O-(6'-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranosyl)-*sn*-glycérol (digalactosyldiacylglycérol ou DGDG) constituent les deux galactolipides majoritaires des membranes chloroplastiques photosynthétiques (Petroutsos et al., 2014, Botté & Maréchal, 2014). Les galactolipides sont constitués d'une tête polaire non chargée composée d'un ou plusieurs galactoses. De par la prédominance des organismes photosynthétiques sur Terre, le MGDG et le DGDG constituent les deux lipides les plus abondants de la biosphère (Gounaris & Barber, 1983). Le MGDG et le DGDG sont des lipides essentiels pour la machinerie photosynthétique (pour revue, Boudière et al., 2014). Chez les endosymbiontes secondaires, la localisation exacte du MGDG et du DGDG au sein des quatre membranes du chloroplaste n'est pas connue (Petroutsos et al., 2014).

Introduction Générale

Nom	Structure schématique	Phase ou structure	Localisation subcellulaire chez les eucaryotes
Tête polaire zwitterionique			
Phosphatidylcholine (PC)		Lamellaire	Un des principaux lipides du réticulum endoplasmique (RE) et des membranes dérivant du RE (système endomembranaire). La PC peut-être le phosphoglycérolipide majoritaire, mais parfois il est mineur, voir totalement absent comme chez <i>Chlamydomonas</i> ou le lipide majoritaire formant des phases lamellaires est le DGTS, un bétaine lipide. La PC est également un composant mineur des chloroplastes primaires (Jouhet et al., 2007).
Phosphatidylethanolamine (PE)		Hexagonale II	Un des principaux lipides du RE et des membranes dérivant du RE. La PE pure forme des structures hexagonales II, mais c'est un composant majeur des bicouches membranaires quand elle est mélangée avec d'autres lipides. La PE est absente des membranes plastidiales.
Tête polaire non chargée			
Monogalactosyldiacylglycérol (MGDG)		Hexagonale II	Glycérolipide majeur des membranes photosynthétiques au sein des chloroplastes (Boudière et al., 2014). Tout comme le DGDG, sa localisation précise dans les plastes secondaires n'a pas été résolue mais il s'agit probablement du composant majeur des thylakoïdes au sein des plastes secondaires (Petroustos et al., 2014, Botté & Maréchal, 2014, Botté et al., 2011).
Digalactosyldiacylglycérol (DGDG)		Lamellaire	Glycérolipide majeur des membranes photosynthétiques. Chez les Angiospermes, le DGDG est relocalisé en dehors du chloroplaste en carence de phosphate, prenant la place de la PC dans les membranes de nombreux organites (Jouhet et al., 2010, Michaud et al., 2016, Botella et al., 2016). Comme le MGDG, sa localisation précise dans les plastes secondaires n'a pas été caractérisée.
Tête polaire anionique			
Phosphatidylsérine (PS)		Lamellaire	Chez la plupart des eucaryotes, la PS est distribuée de façon asymétrique dans les deux feuillettes de la membrane plasmique. La PS est plus abondante sur le feuillet externe de la membrane plasmique. A notre connaissance, la localisation de la PS n'a pas été déterminée chez les microalgues.
Phosphatidylglycérol (PG)		Lamellaire	Le PG peut-être trouvé dans le RE, la mitochondrie où il sert de substrat pour la synthèse du DPG, ainsi que dans le chloroplaste (Boudière et al., 2014).

Introduction Générale

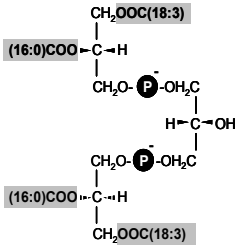
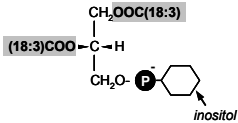
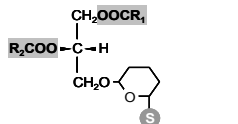
Diphosphatidylglycérol (DPG)		Hexagonale II	Uniquement dans la mitochondrie. Il n'a pas été détecté dans le glycérolipidome de la diatomée <i>Phaeodactylum</i> (Abida et al., 2015) et peut être extrêmement mineur.
Phosphatidylinositol (PI)		Lamellaire	Ubiquitaire
Sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG)		Lamellaire	Chloroplastes (Boudière et al., 2014). Détecté dans la monocouche limitant la gouttelette lipidique de <i>Phaeodactylum</i> (cette thèse).

Tableau 3 : Diversité moléculaire des têtes polaires des glycérolipides membranaires. (modifié d'après Lupette & Maréchal, 2018).

Le 1,2-diacyl-3-O-(6-sulfo-6-deoxy- α -D-glycosyl)-*sn*-glycérol (sulfoquinovosyldiacylglycérol ou SQDG) est un sulfolipide possédant une tête polaire soufrée, le sulfoquinovose (un hexose associé à un groupement sulfate SO_3^-). C'est un lipide négativement chargé et possédant une forme lamellaire dans les membranes chloroplastiques (Boudière et al., 2014). La proportion de SQDG varie entre 2 et 50% chez les plantes supérieures et les algues (Shimojima, 2011). Avant ces travaux de thèse, aucune indication sur la localisation subcellulaire possible du SQDG chez les diatomées, en dehors des thylakoïdes, n'était disponible.

1.2.5. Les bétaine lipides

Les trois principaux bétaine lipides détectés chez les microalgues sont le 1,2-diacylglyceryl-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)- β -alanine (DGTA), le 1,2-diacylglyceryl-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homoserine (DGTS) et le 1,2-diacylglyceryl-3-O-carboxy-(hydroxyméthyl)-choline (DGCC) (**Figure 5**). Les bétaine lipides ne sont pas retrouvés chez les plantes à fleurs. Les bétaine lipides présentent deux acides gras estérifiés en position *sn*-1 et *sn*-2. Le groupe polaire bétaine est non phosphaté et est relié par une liaison éther en position *sn*-3. Ces molécules sont zwitterioniques à pH neutre (une charge positive sur le groupement triméthylammonium $\text{R-N}^+(\text{CH}_3)_3$ et une charge négative sur le groupement carboxyle R-COO^-).

Lors d'une carence en phosphate, les bétaine lipides s'accumulent dans les microalgues et compensent une dégradation des phospholipides (Benning et al., 1995, Geiger et al., 2002, Khozin-Goldberg & Cohen, 2006, Van Mooy et al., 2009, Geske et al., 2013, Riekhof et al., 2014, Abida et al., 2015, Senik et al., 2015, Shemi et al., 2016). Les voies de synthèse des bétaine lipides ont été étudiées uniquement pour le DGTS chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Riekhof et al., 2005) et *Nannochloropsis oceanica* (Murakami et al., 2018). La synthèse du DGTS chez les eucaryotes est effectuée par la bétaine lipid synthase (BTA1) (Riekhof et al.,

2005). Le DGTS a été identifié, par exemple, chez *Picochlorum atomus*, *Nannochloropsis gaditana* et *Chlamydomonas* (Cañavate et al., 2016). Le DGTA a été identifié chez *Phaeodactylum tricornutum* (Abida et al., 2015), *Phaeocystis* sp. (Maat et al., 2014), *Ochromonas danica*, *Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas baltica*, *Chroomonas placodea* (Cañavate et al., 2016) ainsi que chez des algues brunes comme *Fucus vesiculosus*. Le DGTA constitue probablement la plateforme de synthèse de l'EPA chez *Phaeodactylum* (Abida et al., 2015). La synthèse du DGTA chez *Phaeodactylum* est vraisemblablement réalisée par une betaine lipid synthase-like (BTA-like – Phatr3_J42872) (Dolch et al., 2017, Conte et al., 2018, Murakami et al., 2018). Le DGCC a été identifié chez *Chaetoceros gracilis* (Cañavate et al., 2016), *Thalassiosira pseudonana* (Martin et al., 2011), *Pavlova lutheri* (Kato et al., 1996) et *Gyrodinium dorsum* (Cañavate et al., 2016).

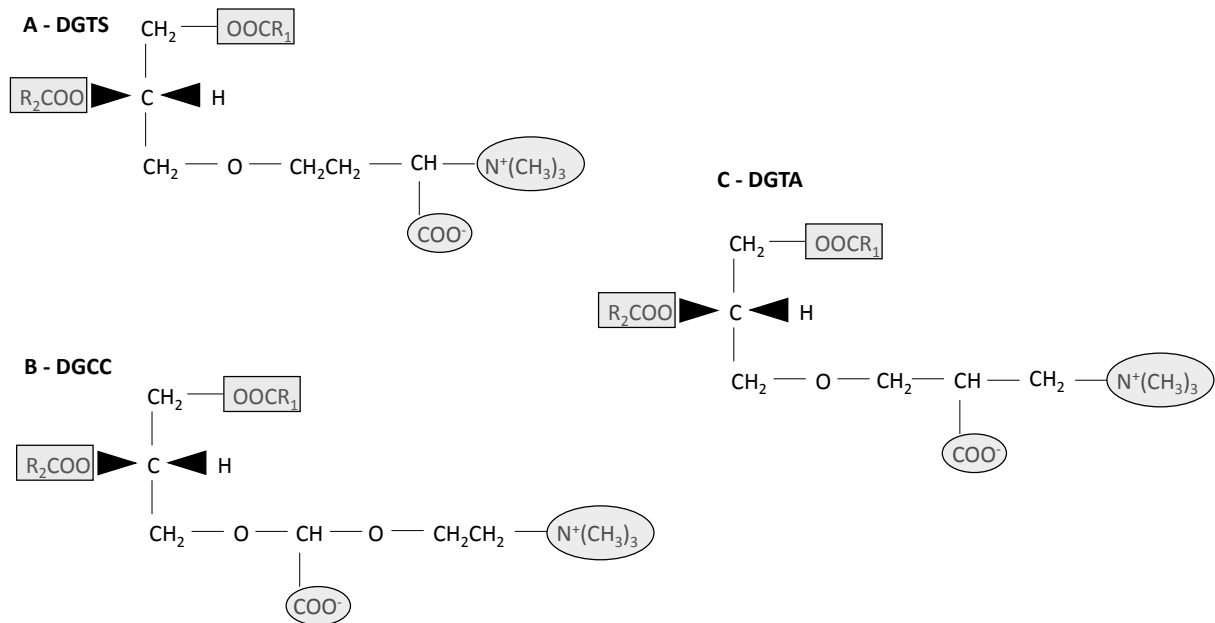


Figure 5 : Structures chimiques des bétaine lipides identifiés chez les microalgues. A : DGTS, 1,2-diacylglyceryl-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homoserine ; B : DGCC, 1,2-diacylglyceryl-3-O-carboxy-(hydroxyméthyl)-choline et C : DGTA, 1,2-diacylglyceryl-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)-β-alanine

1.2.6. Méthodes d'étude des glycérolipides

L'étude des glycérolipides chez les plantes et les microalgues est très active tant pour des questions fondamentales que pour des études appliquées. L'analyse de la biodiversité du phytoplancton aborde de plus en plus la question de la diversité chimique des glycérolipides et la faculté à accumuler des TAGs (Lupette & Maréchal, 2018). Les glycérolipidomes de plusieurs espèces de microalgues telles que *Phaeodactylum tricornutum* (Abida et al., 2015), *Ostreococcus tauri* (Degraeve-Guilbault et al., 2017) ou *Chlamydomonas reinhardtii* (Li-Beisson et al., 2015) ont été publiés ces dernières années. L'étude des glycérolipides commence tout d'abord par une étape d'extraction des lipides à partir d'une quantité

suffisante de cellules. Les deux grandes méthodes d'extraction des lipides ont été publiées à la fin des années 1950 (Folch et al., 1957, Bligh & Dyer, 1959). Suite à l'extraction, il est nécessaire d'évaluer la quantité de lipides des échantillons. Pour cela, il est nécessaire de dissocier les acides gras estérifiés du squelette glycérol par une étape de méthanolyse produisant des méthyl-esters d'acides gras volatils analysables par chromatographie en phase gazeuse. La méthode classique utilisée pour séparer les glycérolipides est la chromatographie sur couche mince (TLC pour Thin Layer Chromatography) en utilisant des mélanges de solvants appropriés pour les lipides polaires et les lipides neutres. Les taches de chacun des glycérolipides sont grattées puis les glycérolipides séparés sont quantifiés par chromatographie gazeuse couplée à une détection à ionisation de flamme (GC-FID) (pour revue, Gros et al., 2018). Les progrès technologiques, notamment au niveau de la spectrométrie de masse à la fin des années 80, permettent aujourd'hui de quantifier les glycérolipides sans passer par une étape de TLC. Cependant, des différences de quantification ont été observées entre les méthodes TLC+GC-FID vs LC-MS/MS (Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem). L'équipe « Biogénèse, Dynamique et Homéostasie des lipides membranaires dans la cellule végétale » a développé une nouvelle méthode basée sur l'ajout d'un standard externe, sous la forme d'un extrait lipidique qualifié et quantifié corrigeant le biais entre les deux techniques (Jouhet et al., 2017).

2. La gouttelette lipidique

2.1. Découverte des gouttelettes lipidiques

Les premières observations et descriptions des gouttelettes lipidiques ont été réalisées par J. Hanstein (Hanstein, 1880), R. Altman (Altmann, 1890) et E.B. Wilson (Wilson 1896) à la fin du XIX^{ème} siècle. Depuis leur découverte, les gouttelettes lipidiques ont été nommées de façon variées : corps lipidiques, corps gras, adiposomes, gouttelettes de gras, liposomes. En 1991, la découverte de la périlipine, une protéine à la surface des gouttelettes lipidiques des cellules et tissus de mammifères a représenté une avancée majeure (Greenberg et al, 1991). En 2018, le mot clé « lipid droplet » mène à près de 11000 articles dans la base de données bibliographiques Pubmed.

2.2. Architecture générale des gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques (*Lipid droplet*, LD) cytosoliques constituent une structure particulièrement bien conservée dans l'arbre du vivant (Murphy, 2012, Walther et al., 2017, Zhang & Liu, 2017). Une gouttelette lipidique est composée d'un cœur hydrophobe (TAGs / stéryl esters / squalène) entourée par une monocouche de glycérolipides polaires, généralement des phospholipides qui peuvent être associés à des stérols, et dans laquelle

s'agencent des protéines de façon transitoire ou permanente (Murphy, 2001, Walther et al., 2017). La fonction des gouttelettes lipidiques dépend de sa composition protéique (Walther et al., 2017, den Brok et al., 2018, Henne et al., 2018). L'architecture générale paraît similaire entre les différents modèles étudiés à ce jour mais il existe de nombreuses différences en termes de composition du cœur hydrophobe et du set de protéines entourant la gouttelette lipidique (**Figure 6**). Il est donc nécessaire de réaliser une investigation complète de la gouttelette lipidique chez des espèces modèles. Les protéines de la gouttelette lipidique sont divisées en deux classes selon leur structure (Kory et al., 2016) :

- Les protéines de classe I présentent un motif hydrophobe en « épingle à cheveux ». Ces protéines sont à la fois localisées sur le réticulum endoplasmique et sur la gouttelette lipidique (oléosine, caléosine, stéréoléosine, Glycérol-3-phosphate acyltransférase 4) (Chapman et al., 2012, Wilfling et al., 2013, Bersuker & Olzmann, 2017)
- Les protéines de classe II présentent une ou plusieurs hélice(s) amphipathique(s). Ces protéines sont traduites dans le cytosol et se lient à la surface de la gouttelette lipidique (périlipines, CTP :phosphocholine cytidyltransférase α) (Krahmer et al., 2011, Rowe et al., 2016, Bersuker & Olzmann, 2017).

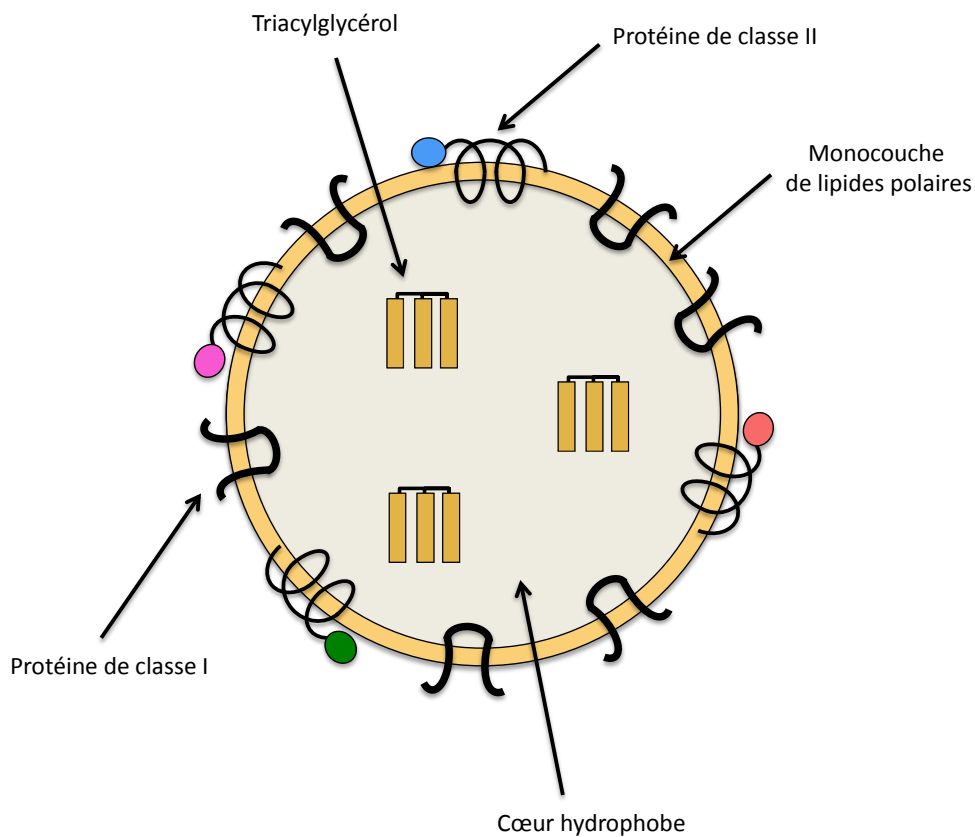


Figure 6 : Schéma général de l'architecture d'une gouttelette lipidique. Le cœur hydrophobe (gris) est entouré d'une monocouche de lipides polaires (en jaune) dans laquelle s'enchassent des protéines de classe I en « épingle à cheveux » et des protéines de classe II présentant une hélice amphipathique.

2.3. Méthodes de détection des gouttelettes lipidiques

Les deux fluorophores les plus couramment utilisés sont le rouge de Nil (Greenspan et al., 1985, Cooksey et al., 1987) et le BODIPY 505/515 (Rumin et al., 2015) ou BODIPY 493/503 (Gocze & Freeman, 1994). Ces fluorophores permettent de déterminer la taille et le nombre de gouttelettes lipidiques de manière semi-quantitative, ainsi que leur localisation cellulaire. De nouveaux fluorophores ont été récemment développés :

- Le Monodansylpentane MDH (Yang et al., 2012, Gidda et al., 2016).
- Les fluorophores AC (Avi-ChemixTM, Avicor Ltd., Szeged, Hongrie) sont des analogues de la thalidomide, un composé anticancéreux provoquant des malformations congénitales. Ces molécules sont compatibles avec les mesures de fluorescence de la GFP (*Green Fluorescent Protein*), la RFP (*Red Fluorescent Protein*) ainsi qu'avec l'autofluorescence de la chlorophylle, les rendant intéressantes pour l'études des organismes végétaux (Kuntam et al., 2015). Une publication récente rapporte l'utilisation de l'AC-202 (dissous dans du DMSO 0,1%), chez deux espèces modèles de microalgues *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornutum* (Harchouni et al., 2018).

2.4. Méthodes de purification des gouttelettes lipidiques

La stratégie générale pour étudier l'architecture des gouttelettes lipidiques est similaire quelque soit l'organisme étudié. Une culture de cellules dans un milieu favorisant le développement de gouttelettes lipidiques est employé (carence en azote par exemple). La purification des gouttelettes lipidiques est initiée par une étape de rupture cellulaire douce (presse de French, disrupteur cellulaire) dans un tampon approprié libérant les gouttelettes ainsi que d'autres composants cellulaires. Il est nécessaire ensuite d'effectuer une purification sur gradient de densité (Brasaemle & Wolins, 2016). De par leur propriété physique (densité inférieure à 1 g/cm³), les gouttelettes lipidiques remontent à la surface du gradient lors de l'ultracentrifugation (Brasaemle & Wolins, 2016). Les gouttelettes lipidiques sont récoltées et lavées à plusieurs reprises avec des tampons appropriés. Le but est d'obtenir une fraction contenant le moins de contaminants possibles (Huang, 2018). L'étude de l'architecture de la gouttelette lipidique repose, en premier lieu, sur la composition du cœur hydrophobe, puis sur la composition de la monocouche de lipides polaires et des protéines à la surface de la gouttelette (le protéome) (Walther et al., 2017). Les analyses protéomiques permettent d'identifier les protéines mais aussi leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation, nitrosylation, ubiquitylation, sumoylation, N et O-glycosylation) ainsi que leur localisation dans des compartiments cellulaires. L'analyse protéomique repose notamment sur trois outils biotechnologiques : la spectrométrie de masse (séparation de molécules chargées en phase gazeuse selon leur rapport

Introduction Générale

masse/charge - m/z), les génomes répertoriés dans des bases de données et des outils bioinformatiques (pour l'identification, la quantification et l'interprétation des résultats). Le protéome doit ensuite être validé par des études biochimiques (western blot) (Mannik et al., 2014) et des études génétiques (mise en place de protéines fusion avec une protéine fluorescence (GFP, YFP, etc.) (Zhang et al., 2012, Maeda et al., 2014, Vrablik et al., 2015, Watanabe et al., 2017, Yoneda et al., 2018, Kretschmar et al., 2018) permettant de vérifier la localisation de la protéine à la surface de la gouttelette lipidique. Enfin, l'étude de mutants présentant une expression altérée (KO, silencing et surexpresser) de gènes codant pour des protéines de la gouttelette permet leur caractérisation fonctionnelle (exemples d'études de génomique fonctionnelle pour la périlipine : Martinez-Botas et al., 2000, Tansey et al., 2001, Inamura et al., 2002, Chang et al., 2006, Imai et al., 2007, McManaman et al., 2013, Granneman et al., 2017, Lee et al., 2018). Les travaux présentés dans ce mémoire suivent cette stratégie générale.

Données Bibliographiques

Partie 1 : Les diatomées et le modèle d'étude *Phaeodactylum tricorutum*

Les microalgues sont des organismes unicellulaires photosynthétiques. La biodiversité des microalgues est importante dans l'arbre du vivant. En effet, les microalgues comprennent aussi bien des procaryotes (cyanobactéries) que des eucaryotes où elles ont évolué en de nombreuses lignées après des événements d'endosymbioses primaire et secondaire. Cette première partie présente les diatomées et se focalise sur le modèle d'étude *Phaeodactylum tricorutum*.

1. Généralité sur les diatomées

1.1. Les diatomées sont des *Heterokonta*

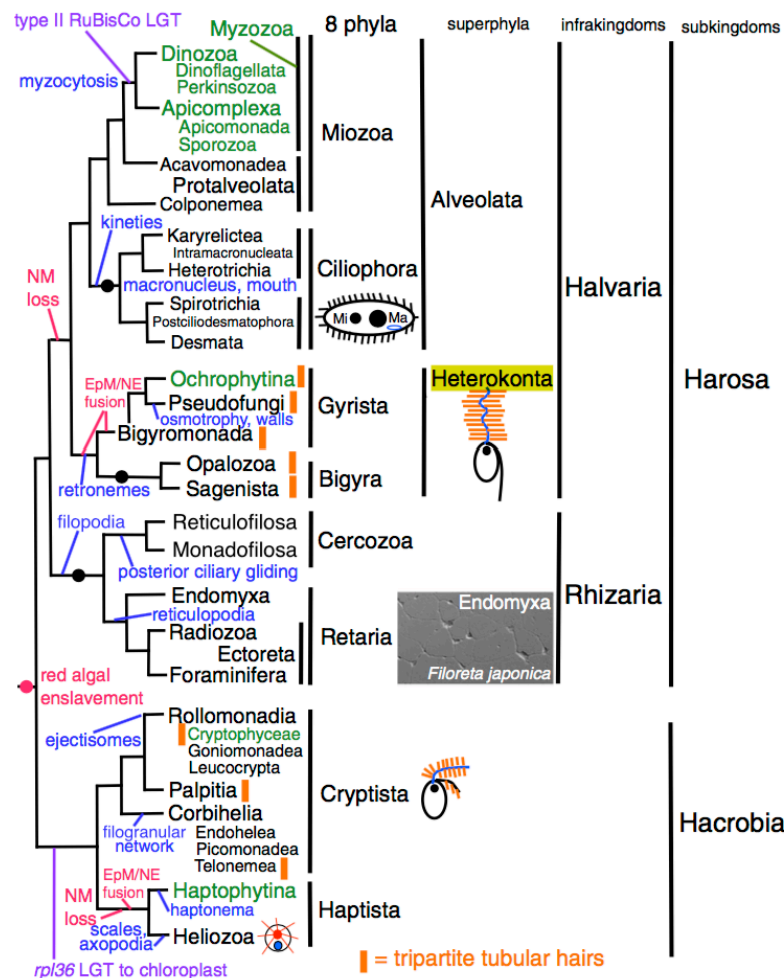


Figure 7 : Phylogénie des *Chromista*. Les subphylla apparaissant en vert possèdent un chloroplaste ancestral provenant d'une algue rouge acquise lors d'une endosymbiose secondaire (cf. point 1.2.). Les clades purement hétérotrophes sont représentés en noir (D'après Cavalier-Smith, 2018).

Les *Heterokonta* (ou Straménopiles) constituent un superphylum dans le règne des *Chromista* (Cavalier-Smith, 2018) (Figure 7). Ils sont caractérisés par l'existence au cours

de leur cycle de vie d'une cellule biflagellée de taille inégale (*hetero* = différent ; *konte* = flagelle) : un flagelle antérieur plumeux possédant un mastigonème (prolongements tubulaires de la membrane d'un flagelle) tripartite et d'un flagelle postérieur court et lisse. Les diatomées constituent une lignée particulière car elles ont perdu au cours de leur évolution le mastigonème. Les *Heterokonta* sont divisés en deux phylums :

- Les *Gyrista* incluant les *Ochrophytina* (Diatomées), les *Pseudofungi* (Oomycète comme *Phytophthora infectans* et les Hyphochytriomycetes) et les *Bigyromonada* (photohétérotrophes biciliés non-amiboïdes).
- Les *Bigyra* incluant les *Opalozoa* (Opalines) et les *Sagenista* (Labyrinthulides et Thraustochytrides comme *Auranthiochytrium*) (Dellero et al., 2018).

1.2. Les *Heterokonta* sont des organismes complexes issus d'une endosymbiose secondaire

Le premier fossile connu de diatomée pennée est daté de 90 millions d'années (Bowler et al., 2008). Le chloroplaste des *Heterokonta* est issu d'un évènement d'endosymbiose secondaire entre une algue rouge qui a été acquise par une cellule hôte eucaryote (**Figure 8**). La réduction de l'algue rouge endosymbionte a conduit à la formation d'un chloroplaste à quatre membranes (Dorrell & Smith, 2011, Petroutsos et al., 2014). Les deux membranes les plus internes du chloroplaste sont dérivées de la cyanobactérie initiale (Maréchal, 2018b, Fussy & Obornik, 2018), la troisième membrane provient de l'endosymbionte primaire et la quatrième membrane la plus externe dérive de la cellule hôte eucaryote lors de l'endosymbiose secondaire (Petroutsos et al., 2014). Notre laboratoire a également montré qu'il existait une connexion entre la membrane la plus externe du chloroplaste et la membrane externe de l'enveloppe nucléaire chez *Phaeodactylum* (Flori et al., 2016). A la différence des plastes primaires des plantes supérieures, la composition lipidique de chacune des 4 membranes est actuellement inconnue.

1.3. Morphologie des diatomées

Les diatomées sont entourées d'un « squelette » externe siliceux appelé la frustule servant de protection pour la diatomée. La frustule est une coque de silice hydratée $(\text{SiO}_2)_n (\text{H}_2\text{O})_n$ (Crawford et al., 2001) conférant des structures géométriques diversifiées (**Figure 9**). La frustule est composée de deux thèques (épithèque et hypothèque) s'emboîtant comme un couvercle sur une boîte. Chaque thèque est subdivisée également en deux parties : la valve et le cingulum. Les thèques peuvent également présenter à leurs surfaces des ornements.

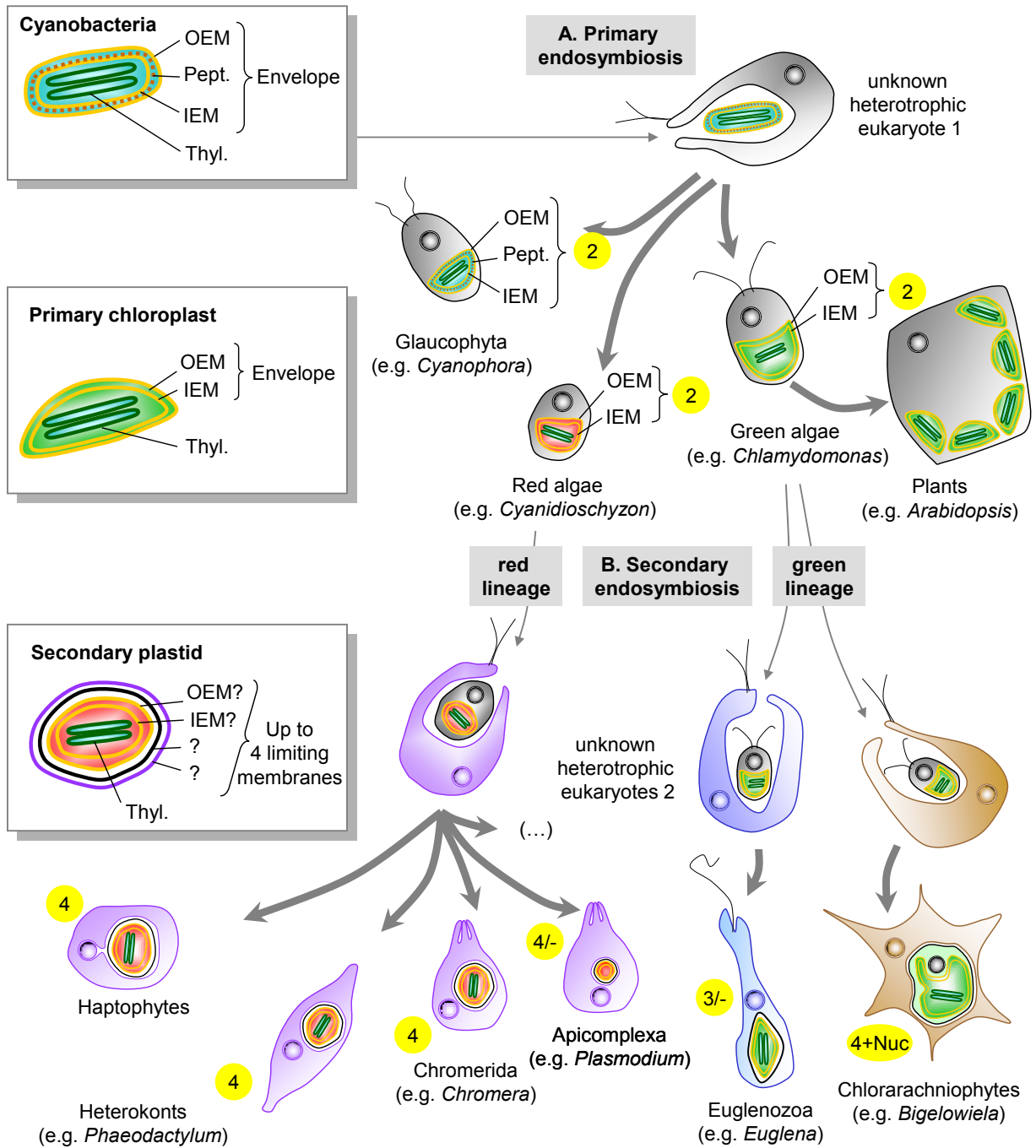


Figure 8 : Évolution des plastes primaires et secondaires. A, Endosymbiose primaire : un événement unique d'endosymbiose entre un eucaryote hétérotrophe inconnu et une cyanobactérie Gram négative a conduit à la formation de trois lignées possédant un plaste primaire à deux membranes, la lignée bleue (glaucocystophytes), la lignée rouge (algues rouges), et la lignée verte (algues vertes et plantes : *Viridiplantae*). **B, Endosymbioses secondaires :** Au moins deux événements d'endosymbiose secondaire ont eu lieu au cours de l'évolution des plastes. Une première endosymbiose entre une algue rouge et un hôte hétérotrophe inconnu a généré de multiples lignées dont les *Haptophyta*, les *Heterokonta*, les *Chromerida* et les *Apicomplexa*. Au moins deux événements endosymbiotiques indépendants entre une algue verte et un eucaryote hétérotrophe inconnu ont abouti aux lignées des *Euglenozoa* et des Chlorarachniophytes. Le nombre de membranes délimitant les plastes primaire et secondaire est surligné en jaune. Les phylla ayant perdu leur plaste chez certains organismes sont représentés par un « - ». Les phylla dans lesquels le noyau primaire a été conservé en tant que nucléomorphe est indiqué par « + Nuc ». (D'après Petroutsos et al., 2014).

Depuis plusieurs millions d'années, les diatomées mortes sédimentent au fond des océans formant des couches siliceuses. Les dépôts de frustules de diatomées forment la diatomite qui est utilisée pour de nombreuses applications comme stabilisateur de la nitroglycerine (Nobel, 1867), sorbants, dessicateur ou catalyseur (Ivanov & Belyakov, 2008). Des applications nanotechnologiques en substituant la silice par des oxydes métalliques afin de fabriquer des semi-conducteurs sont également possibles (Rorrer et al., 2005, Jeffryes et al., 2008, Jaccard et al., 2009, Mishra et al., 2017).

Les diatomées sont divisées en deux grandes catégories en fonction de leur frustule : les diatomées pennées et les diatomées centriques (Theriot et al., 2010). Cette divergence entre diatomées pennées et centriques a eu lieu il y a 90 millions d'années. On estime que 40% des gènes ne sont pas partagés entre ces deux groupes (Bowler et al., 2008).

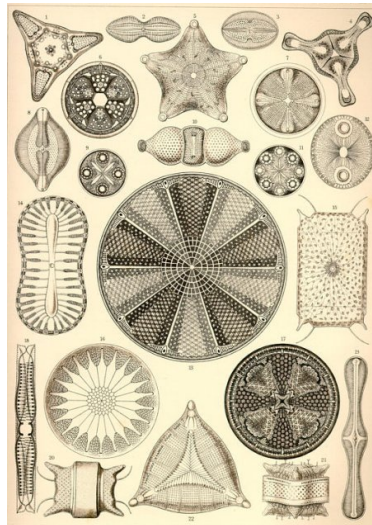


Figure 9 : Lithographie illustrant la diversité morphologique des diatomées (D'après Haeckel, 1904)

Les diatomées centriques présentent une frustule circulaire, triangulaire ou quadratiques dans la vue valvaire. Dans la vue cingulaire, les diatomées centriques sont de section rectangulaire ou ovale. Les diatomées centriques possèdent donc une symétrie radiale. Les diatomées centriques ne présentent pas de raphé (araphide) à la différence des diatomées pennées (**Figure 10**).

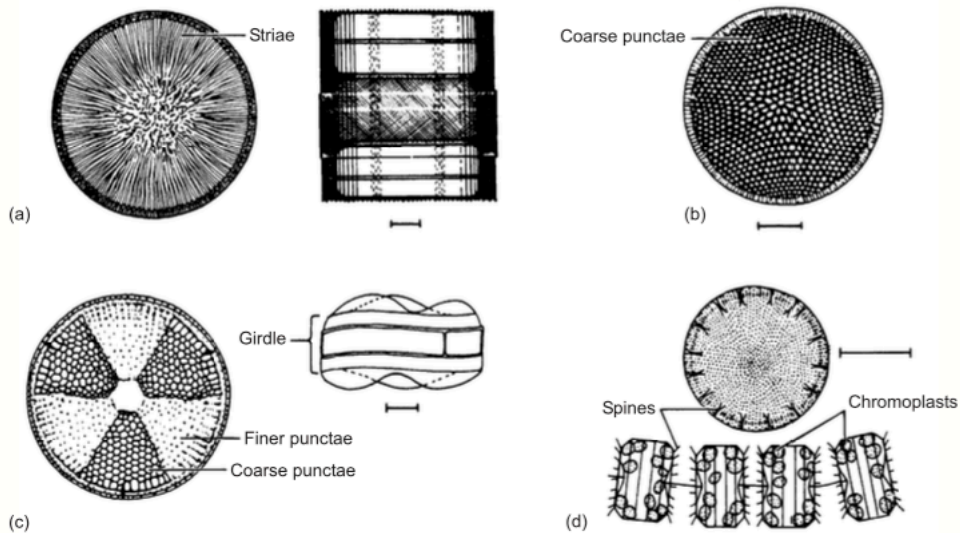


Figure 10: Morphologie des diatomées centriques. (a) *Melosira*, (b) *Coscinodiscus* (c) *Actinoptychus* et (d) *Thalassiosira* (D'après Armstrong & Brasier, 2013)

Les diatomées pennées possèdent une frustule elliptique ou rectangulaire dans la vue valvaire. Ces diatomées présentent donc une symétrie bilatérale définie par le raphé. Le raphé est une rainure centrale permettant la communication avec le milieu extérieur ainsi qu'une pseudo-locomotion lors de l'excrétion du mucilage. Le raphé présente un nodule terminal (épaississement siliceux) à chaque extrémité et un nodule central (**Figure 11**).

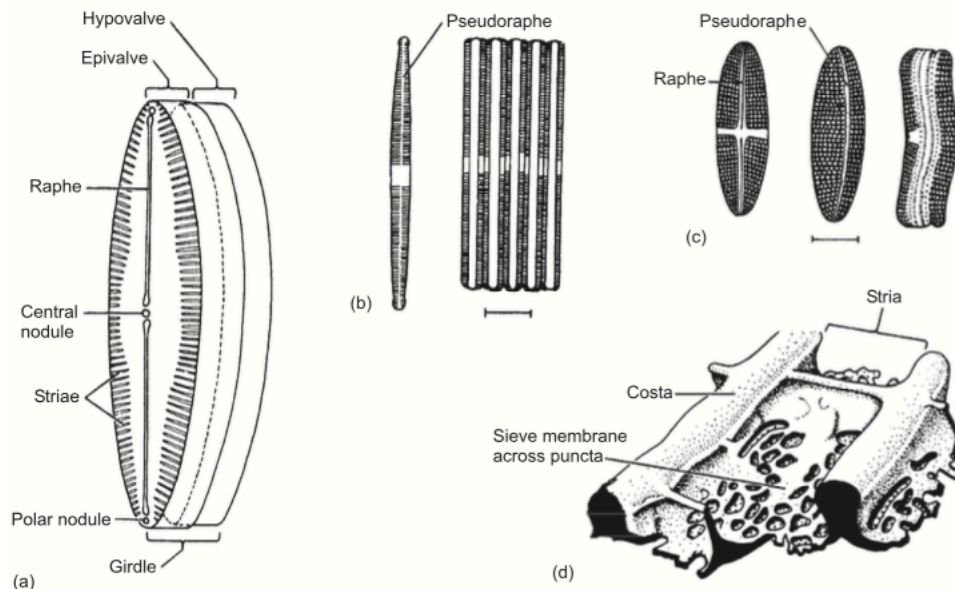


Figure 11 : Morphologie des diatomées pennées. (a) *Pinnularia* (b) *Fragilaria* (c) *Achnanthes* (d) Détail d'une aréole de Diatomée. Échelle = 10 μ m (D'après Armstrong & Brasier, 2013).

1.4. Cycle de vie des diatomées

Le cycle de vie des diatomées est haplodiplophasique (**Figure 12**). La reproduction des diatomées peut s'effectuer de deux façons différentes, principalement par une multiplication cellulaire végétative mais également par une reproduction sexuée. La multiplication cellulaire végétative s'effectue par division mitotique lorsque les conditions de vie sont favorables. Une à huit fois par jour, la cellule parente donne deux cellules filles. Chaque génération de diatomée provoque une diminution de taille d'une des lignées car une valve provient de la cellule mère (l'épithèque), la deuxième est reconstituée par la cellule fille (l'hypothèque) (Hasle et al., 1996). Lorsque la taille de la cellule est fortement réduite (environ 30% de la taille de la cellule initiale), la reproduction sexuée se met en place et conduit à une division cellulaire qui compense la perte de taille (Mishra et al., 2017). Après la méiose, la motilité des spermatozoïdes diffère selon les types des diatomées. Les gamètes des diatomées pennées présentent une isogamie, c'est à dire une perte du flagelle (**Figure 12A**) (Hasle et al., 1996, Horner, 2002). Les gamètes des diatomées centriques présentent une oogamie, c'est-à-dire que le gamète mâle présente un flagelle alors que le gamète femelle est immobile (**Figure 12B**). Des processus d'anisogamie ont été également décrits chez certaines espèces de diatomées pennées araphides. La méiose des cellules végétatives ($2n$) aboutit à la formation des gamètes (n). Les gamètes mâle et femelle fusionnent pour former le zygote qui perd sa thèque en silice, formant l'auxospore. L'auxospore forme ensuite une nouvelle cellule initiale de taille maximale démarrant un nouveau cycle générationnel diploïde.

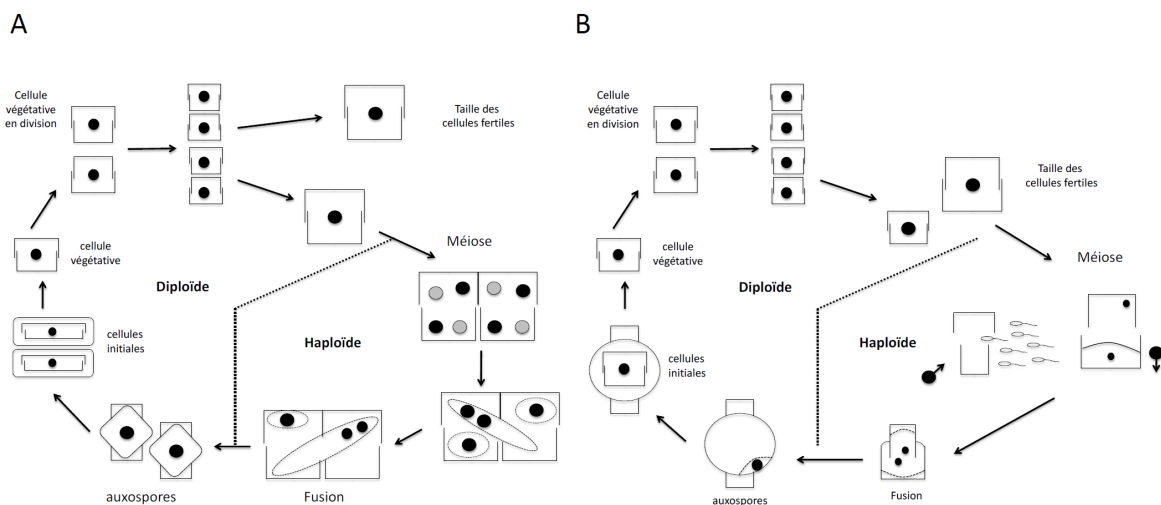


Figure 12 : Cycle de vie haplodiplophasique des Diatomées. A, Cycle de vie d'une diatomée pennée. B, Cycle de vie d'une diatomée centrique.

1.5. Importance écologique des diatomées

Les diatomées sont des organismes autotrophes constituant un des groupes de protistes unicellulaires photosynthétiques les plus abondants, avec plusieurs dizaines de milliers d'espèces différentes (Armbrust, 2009). La répartition des diatomées est mondiale car on les retrouve dans les océans, ainsi que les eaux douces ou saumâtres. Elles vivent aussi bien dans la colonne d'eau de façon libre (le *pelagos*) ou accrochées à un substrat (le *benthos*). Elles contribuent à au moins 20% de la production primaire mondiale (c'est-à-dire la vitesse à laquelle se forme une quantité donnée de matière organique), représentant environ 45 gigatonnes de carbone organique par an (Field et al., 1998, Falkowski et al., 1998). La production primaire s'effectue principalement avec la fixation du CO₂ par la photosynthèse. Les diatomées se trouvant à la base des réseaux trophiques, elles constituent un élément indispensable à la nutrition des animaux benthiques et pélagiques, notamment de part leur richesse en acides gras (Dolch & Maréchal, 2015). Chez les diatomées, une des principales sources de stockages du carbone est soit sous la forme de triacylglycérols (TAGs), au sein de gouttelettes lipidiques, soit sous forme de chrysolaminarine, un polymère de glucose (Maeda et al., 2017). La taille et le nombre de gouttelettes lipidiques chez les diatomées sont variables entre les espèces.

2. *Phaeodactylum tricornutum*

De part leur importance écologique, les diatomées constituent aujourd'hui l'embranchement de microalgues issu d'une endosymbiose secondaire le plus étudié. Plusieurs espèces modèles telles que *Phaeodactylum tricornutum* ou *Thalassiosira pseudonana* ont été proposées et leurs génomes ont été séquencés (Armbrust et al., 2004 pour *Thalassiosira pseudonana* ; Bowler et al., 2008 pour *Phaeodactylum tricornutum*). Nous avons focalisé l'étude des gouttelettes lipidiques dans cette thèse sur le modèle *Phaeodactylum tricornutum*.

2.1. Découverte et classification taxonomique

Phaeodactylum tricornutum constitue la seule espèce du genre *Phaeodactylum*. La première description de *Phaeodactylum tricornutum* a été réalisée par K. Bohlin en 1897 (Bohlin, 1897). Le genre *Phaeodactylum* appartient à l'ordre des Naviculales, décrit par Charles Edwin Bessey en 1907.

2.2. Pléomorphisme de *Phaeodactylum*

Phaeodactylum tricornutum présente une taille comprise entre 10 et 20 µm dont une majorité du volume est occupé par le chloroplaste. *Phaeodactylum* présente la particularité de

posséder trois morphotypes principaux (pléomorphisme) : ovale, fusiforme et triradiée (Abida et al., 2015). Un quatrième morphotype cruciforme a été également décrit (He et al., 2014). Il n'est pas certain que le morphotype triradié soit le plus abondant dans les océans ; le morphotype oval correspond à une forme de stress (De Martino et al., 2007). Il existe 11 écotypes connus de *Phaeodactylum* (Pt1 à Pt10 + PtHK). Chaque écotipe présente un morphotype majoritaire, cultivé *in vitro*, représenté sur la **Figure 13**.

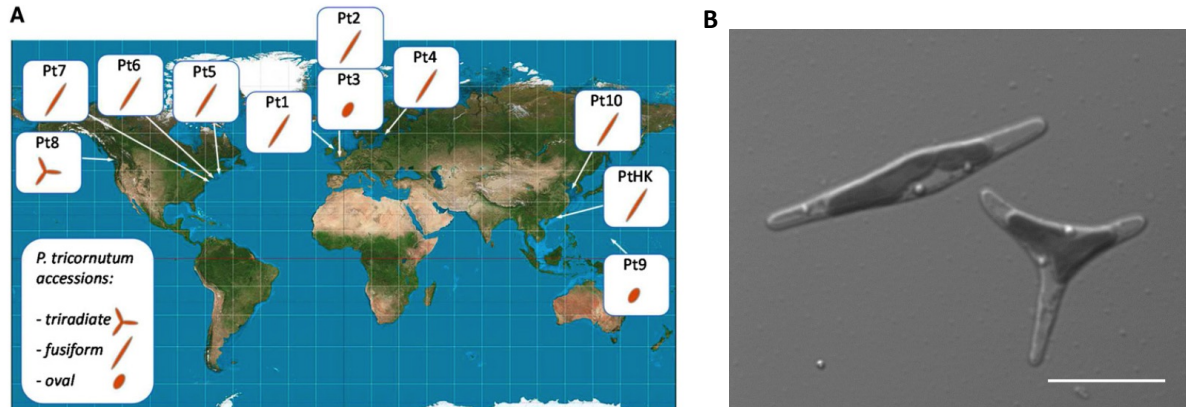


Figure 13 : Origine géographique et principaux morphotypes des accessions de *Phaeodactylum*. A, Les zones d'origine de l'échantillonnage des accessions de Pt sont indiquées: Pt1 au large de Blackpool (Royaume-Uni); Pt2 et Pt3 au large de Plymouth, (Royaume-Uni); Pt4 près de l'île de Segelska ; Pt5 dans le golfe du Maine; Pt6 au large de Woods Hole, Massachusetts; Pt7 au large de Long Island, New York; Pt8 près de Vancouver, Canada; Pt9, territoire de Guam, Micronésie; PtHK, près de Hong Kong; et Pt10, dans la mer Jaune. La souche génomique Pt1 8.6 dérive de l'accession Pt1. Pt3 est un écotipe de stress dérivant de Pt2. Les morphotypes majeurs observés pour chaque accession dans l'eau de mer artificielle sont indiqués (c'est-à-dire les morphotypes triradié, fusiforme et ovale). (d'après De Martino et al., 2007, Abida et al., 2015). **B, observation au microscope confocale de cultures de *Phaeodactylum* Pt1.** Barre d'échelle, 10 µm (Photo : Antoine Jaussaud).

2.3. Un modèle de génétique fonctionnelle

De nombreux travaux de génétique fonctionnelle ont été réalisés chez le modèle d'étude *Phaeodactylum*. En effet, le génome nucléaire, mitochondrial (Bowler et al., 2008) ainsi que le génome plastidial (Oudot-Le Secq et al., 2007) sont séquencés, et il est possible de transformer *Phaeodactylum* à l'aide de vecteurs permettant les études de génomique fonctionnelle (De Riso et al., 2009). Le génome de *Phaeodactylum* mesure 27,4 Mb avec 10402 gènes prédits (Bowler et al., 2008).

Les avancées méthodologiques récentes se sont concentrées sur la mise en place de méthodes d'édition des génomes chez les microalgues, telle que les méthodes de méganucléases (MN), de Transcription-Activator-Like-Effector Nucleases (TALEN) et de Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9) (**Figure 14**). Ces méthodes provoquent des cassures doubles brins sur des portions définies de séquences d'ADN par des nucléases. La réparation de ces cassures entraîne des mutations

de la séquence d'ADN (insertion, délétion, décalage du cadre de lecture) (Voytas, 2013). Des résultats ont été obtenus chez les modèles *Chlamydomonas reinhardtii* (Shin et al., 2016) et *Nannochloropsis* dans un premier temps (Wang et al., 2016). L'efficacité des TALEN a été démontrée chez *Phaeodactylum* (Daboussi et al., 2014, Mann et al., 2017). Une méthode d'édition des génomes par la technologie CRISPR/Cas9 a été également publiée pour le modèle *Phaeodactylum* (Nymark et al., 2016, Stukenberg et al., 2018) ainsi que pour le modèle *Thalassiosira pseudonana* (Hopes et al., 2016). Ces méthodes sont autant d'outils pour avancer dans la compréhension des fonctions portées par des gènes d'intérêt chez les diatomées. D'un point de vue appliqué, ces technologies peuvent permettre de développer des souches de microalgues pouvant accumuler certains acides gras ou glycérolipides en particulier, intéressants pour leurs propriétés de biocarburant (TAGs) ou pour la santé humaine (EPA/DHA) par exemple.

La mise en place d'un modèle de génétique fonctionnelle nécessite de connaître une méthode de transformation efficace. La méthode la plus couramment utilisée chez les plantes supérieures est le bombardement par des particules de tungstène ou d'or. Cette méthode est efficace chez *Phaeodactylum* (Zaslavskaja et al., 2000) mais il est également possible de la transformer par des méthodes d'électroporation (Niu et al., 2012, Miyahara et al., 2013, Zhang & Hu, 2014) et de conjugaison bactérienne (Karas et al., 2015, Slattery et al., 2018) avec des rendements d'efficacité moins importants. L'insertion d'ADN étranger dans le génome des diatomées se faisant de façon aléatoire, il est courant d'obtenir des lignées avec des niveaux d'expressions très variable (Chu et al., 2016). Il est cependant possible de réaliser des lignées knock-down (anti-sens ou RNAi), knock-out (KO) et surexpresser (OE). La première lignée RNAi chez *Phaeodactylum* a été obtenue pour les gènes codant pour le phytochrome (DPH1) et le cryptochrome (CPF1) (De Riso et al., 2009). La machinerie des microRNA a également été identifiée chez *Phaeodactylum* (Kaur et al., 2015).

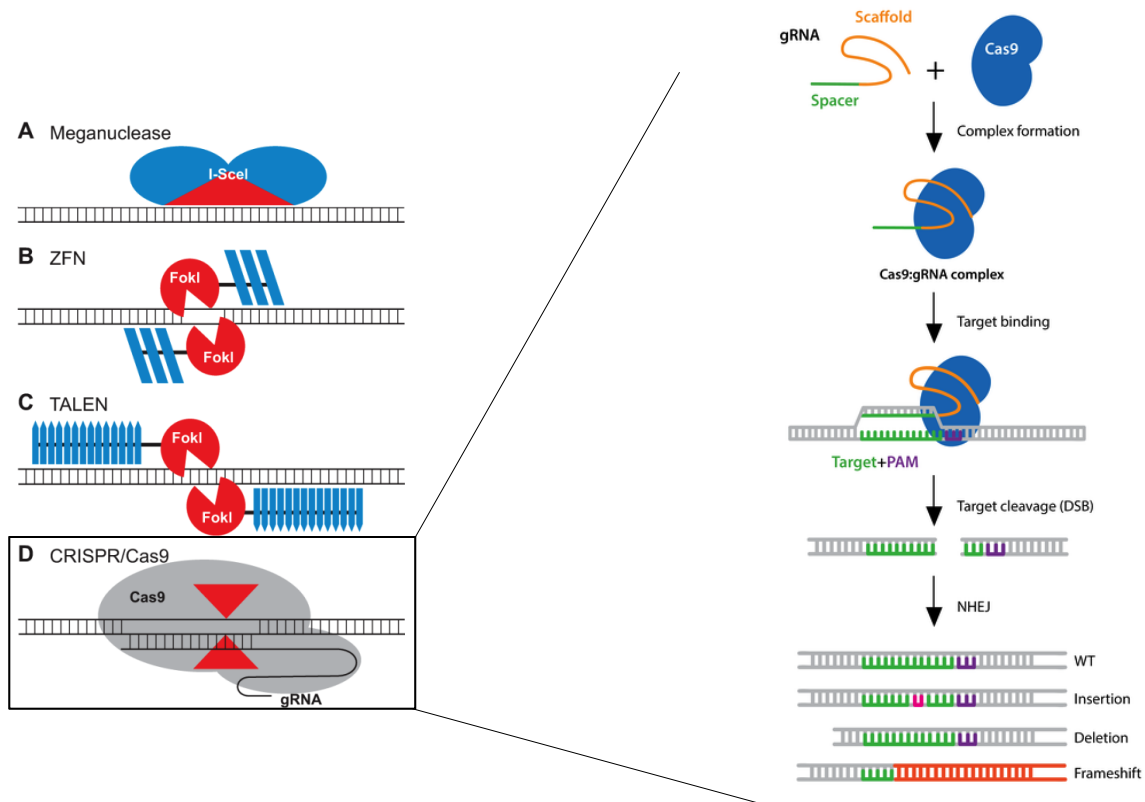


Figure 14 : Méthodes générales d'édition des génomes. A, les Méganucléases. Ce sont des endonucléases pouvant reconnaître des séquences d'ADN de grandes tailles (12 à 40 pb). La méganucléase I-SceI reconnaît ici la séquence d'ADN cible. Cette technologie est aujourd'hui abandonnée car la méganucléase doit être adaptée à la séquence cible (Paques & Duchateau, 2007, Smith et al., 2006). **B, les nucléases à doigt de zinc (ZFN).** Les nucléases à doigt de zinc sont des enzymes de restrictions synthétiques qui se lient à l'ADN par des protéines à doigts de zinc (en bleu) couplées au domaine catalytique de l'endonucléase FokI (en rouge) séparés d'une séquence d'espacement de 5 à 7 pb. La dimérisation de FokI en C-terminal permet le clivage (Bibikova et al., 2003, Carroll, 2011). **C, les enzymes de restriction TALEN.** Cette technologie est proche de celle des nucléases à doigt de zinc avec un domaine de liaison à l'ADN TALE (en bleu) couplé à FokI (en rouge). Le domaine de liaison TAL (Transcription activator-like effectors) est constitué d'une répétition de 33 à 35 acides aminés identiques à l'exception de deux acides aminés (Bogdanove & Voytas, 2011, Christian et al., 2010). **D, la technologie CRISPR/Cas9.** La reconnaissance de la séquence cible d'ADN est réalisée par appariement des bases avec un ARN guide (gRNA). L'ARN guide est un ARN synthétique court composé d'une séquence « scaffold » (en orange) nécessaire à la liaison de Cas et d'un « spacer » (en vert) d'environ 20 nt dépendant de la cible génomique. L'association du « scaffold » de l'ARN guide avec la Cas9 provoque le changement de conformation de Cas9 devenant active pour s'associer à l'ADN. Le Protospacer Adjacent Motif (PAM en violet) est une séquence d'ADN de 2 à 6 paires de bases (5'-NGG-3' en général avec N, une nucléobase A, T, C ou G) qui suit immédiatement la séquence d'ADN ciblée par la nucléase Cas9. Cas9 présente deux domaines endonucléases : RuvC et HNH (Gasiunas et al., 2012, Jinek et al., 2012). L'association du complexe ARNg/Cas9 avec l'ADN cible provoque le clivage double brin (DSB pour Double-Strand Break) de l'ADN cible (3 à 4 nt en amont de la séquence PAM). La cassure double brin est ensuite réparée par l'une des deux voies de réparation : NHEJ (Non-Homologous end Joining) ou HDR (Homology directed repair). Le mécanisme de réparation NHEJ est le plus employé et provoque l'apparition de petites insertions ou délétions de nucléotides (indels). (Modifié d'après Voytas & Gao, 2014).

2.4. Un modèle pour tenter de reprogrammer le métabolisme des lipides ?

Phaeodactylum constitue une espèce modèle pour la recherche sur les glycérolipides, entre autre car elle permet de servir de système d'exploration ou de validation pour des applications industrielles (Wen & Chen, 2003, Medipally et al., 2015, Hamilton et al., 2016, Vinayak et al., 2015). La production de biocarburants algosourcés se focalise sur la production de triacylglycerols qui s'accumulent sous la forme de gouttelettes lipidiques. La façon la plus courante pour accumuler ces TAGs est de réaliser des carences nutritives (Abida et al., 2015, Du & Benning, 2016).

Il existe trois grandes stratégies de reprogrammation du métabolisme lipidique visant à une accumulation de TAGs, par ingénierie moléculaire. Ces stratégies sont dites : « Push », « Pull » et « Protect » (Xu & Shanklin, 2016) :

- 1) Méthode « Push » : Le but est ici d'augmenter la synthèse des précurseurs des triacylglycérols en amont (acétyl-CoA, acides gras, etc.).
- 2) Méthode « Pull » : Cette méthode vise à augmenter l'assemblage des TAGs, en aval.
- 3) Méthode « Protect » : Le but est de protéger les gouttelettes lipidiques de la dégradation en particulier par des lipases.

En comparaison des végétaux supérieurs (*Viridiplantae*), les connaissances sur le métabolisme des glycérolipides sont très pauvres chez les endosymbiontes secondaires. De façon schématique, le métabolisme des lipides comprend trois grands modules :

- 1) la synthèse des acides gras dans le chloroplaste
- 2) le transport des acides gras à l'intérieur et à l'extérieur du chloroplaste
- 3) la construction des différents glycérolipides à partir de ces acides gras

2.4.1. La synthèse des acides gras

La synthèse des acides gras chez les diatomées s'effectue de la même façon que chez les plantes supérieures (**Figure 15**). Dans un premier temps, un pool d'acétyl-CoA est produit (Ke et al., 2000). L'acétyl-CoA peut être synthétisé par deux voies :

- 1) L'acétyl-CoA peut être produit dans la mitochondrie à partir d'acétate libre issu du Cycle de Krebs par l'action d'une acétyl-CoA synthétase (ACS) (Lin & Oliver, 2008). Cette première voie forme un pool d'acétyl-CoA mitochondrial.
- 2) L'acétyl-CoA peut être synthétisé dans le chloroplaste par la décarboxylation du pyruvate par l'action du complexe pyruvate deshydrogénase (PDH). Cette deuxième voie constitue la voie majoritaire pour la synthèse du pool d'acétyl-CoA dans les graines des plantes supérieures (Ke et al., 2000).

Une étude de génie génétique a montré que la mise en place d'une lignée antisens de la PDH chez *Phaeodactylum* (Phatrdraft_50961) n'entraînait pas de modification du profil des acides gras mais une augmentation de l'accumulation de Rouge de Nil (jusqu'à 82%) signifiant une accumulation plus importante de lipides neutres (Ma et al., 2014).

Le chloroplaste est le site principal de synthèse des acides gras. Le pool d'acétyl-CoA chloroplastique constitue le substrat primaire pour cette synthèse, en plusieurs étapes, impliquant différents complexes enzymatiques. L'acétyl-CoA est tout d'abord converti en malonyl-CoA par une acétyl-CoA carboxylase (ACCase) qui ajoute un groupement carboxyle (R-COOH), de façon irréversible. L'ACCase plastidiale de *Phaeodactylum tricornutum* (Phatr2_54926) a été exprimée chez *Escherichia coli* (Xie et al., 2013) ce qui conduit à une augmentation d'un facteur 2 de la quantité de lipides neutres par rapport au contrôle ainsi qu'une augmentation des acides gras mono-insaturés (MUFAs). Ces résultats s'opposent à la surexpression de ACC1 chez deux autres espèces de diatomées : *Cyclotella cryptica* et *Navicula sapuvila* où aucune accumulation de lipides n'était pas observée (Dunahay et al., 1995, Roessler, 1990).

La MCAT (Malonyl-CoA : acyl-carrier protein transacylase – Phatr3_J37652 chez *Phaeodactylum*) catalyse la condensation du malonyl-CoA en malonyl-ACP. La caractérisation fonctionnelle de la MCAT n'a pas été réalisée au sein des *Heterokonta*. La synthèse des acides gras s'effectue de la même façon chez diatomées et les endosymbiontes primaires (*Viridiplantae* et algues vertes). On distingue deux types d'acides gras synthèses (FAS) chez les organismes vivants : FAS I (Fatty Acid Synthase de type I) et FAS II (Fatty Acid Synthase de type II). Le système FAS II correspond à des enzymes dissociées, semblables aux FAS II bactériennes, localisé dans le stroma du plaste. Le système FAS II est l'acteur principal de la synthèse des acides gras chez les diatomées (Ryall et al., 2003). A partir du malonyl-ACP, une succession de quatre réactions enzymatiques transfère deux carbones par cycle d'élongation des acides gras. La première réaction consiste en la condensation d'un acétyl-CoA avec un malonyl-ACP, formant après décarboxylation une molécule de 3-ketoacyl-ACP. La première réaction est catalysée par la β -ketoacyl-ACP synthase III (KASIII). Le 3-ketoacyl-ACP est ensuite réduit en 3-hydroxyacyl-ACP par la 3-ketoacyl-ACP-réductase, NADPH-dépendante (KAR : Phatr3_J13073). Les deux dernières réactions consistent en la synthèse d'un groupement acyl : ceci est réalisé successivement par une Hydroxyacyl-ACP Déshydratase (HAD : Phatr3_J55157) formant du 2,3-transenoyl-ACP, qui est réduit par une Enoyl-ACP réductase (ER : Phatr3_J10068). Le groupement acyl est transféré sur un ACP (Acyl Carrier Protein) libre par une ACP acyltransférase. Chez les diatomées, le cycle aboutit uniquement à la formation de 16:0-ACP

après 7 cycles (Dolch et al., 2017) et non à la formation de 18:0-ACP et de 18:1-ACP comme chez *Arabidopsis thaliana* par exemple.

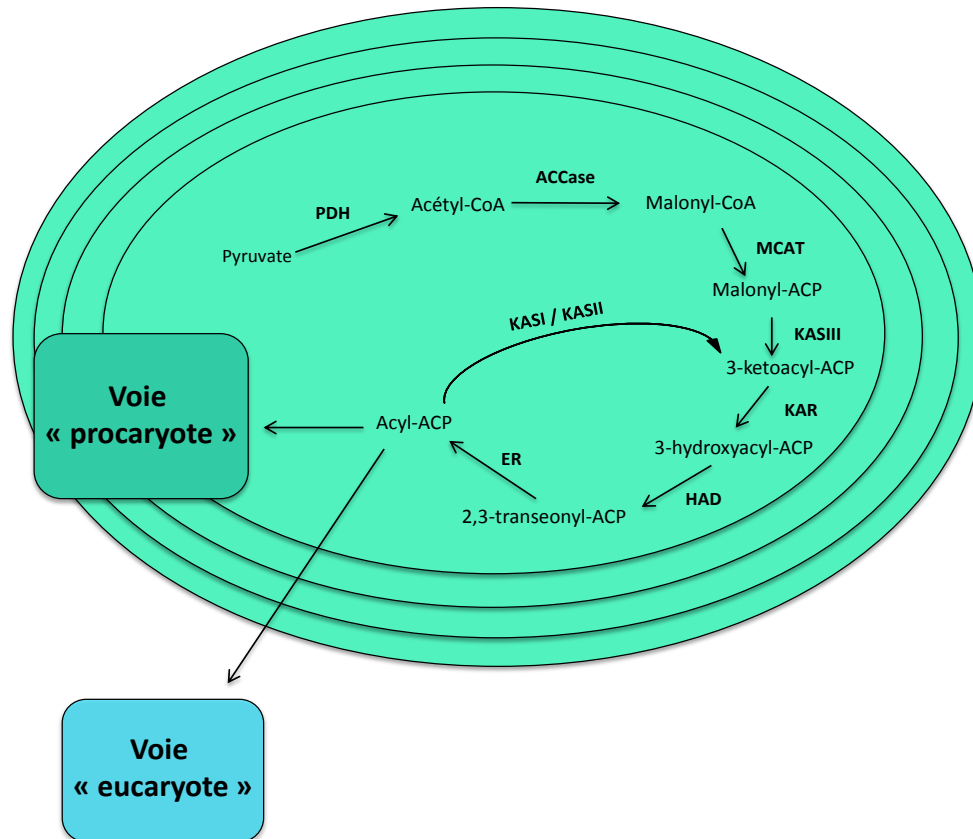


Figure 15 : Représentation schématique de la synthèse des acides gras chez *Phaeodactylum tricornutum*. PDH, Pyruvate deshydrogénase ; ACCase, acétyl-CoA carboxylase ; MCAT, Malonyl-CoA:acyl-carrier protein transacylase ; KASI : Ketoacyl-ACP synthase I ; KASII, ketoacyl-ACP synthase II ; KASIII, β -ketoacyl-ACP synthase III ; KAR, 3-ketoacyl-ACP-réductase, NADPH-dépendante ; HAD, Hydroxyacyl-ACP Déshydratase ; ER, Enoyl-ACP réductase.

2.4.2. Le transfert des acides gras du chloroplaste vers le cytosol

Les acides gras synthétisés sont dans un premier temps liés à des acyl carrier protein (ACPs) dans le stroma du chloroplaste. Il existe ensuite deux voies majeures pour ces acyl-ACP :

1) une incorporation directe dans le chloroplaste vers la voie dite « procaryote » (en vert sur la **Figure 16**).

2) un export en dehors du chloroplaste vers le cytosol pour le processus d'élongation/désaturation conduisant aux VLC-PUFAs et l'incorporation dans les glycérolipides au niveau du réticulum endoplasmique en empruntant la voie dite « eucaryote » (en bleu sur la **Figure 16**). Cet export en dehors du chloroplaste constitue un sujet majeur d'étude car il est quasiment inconnu chez les diatomées.

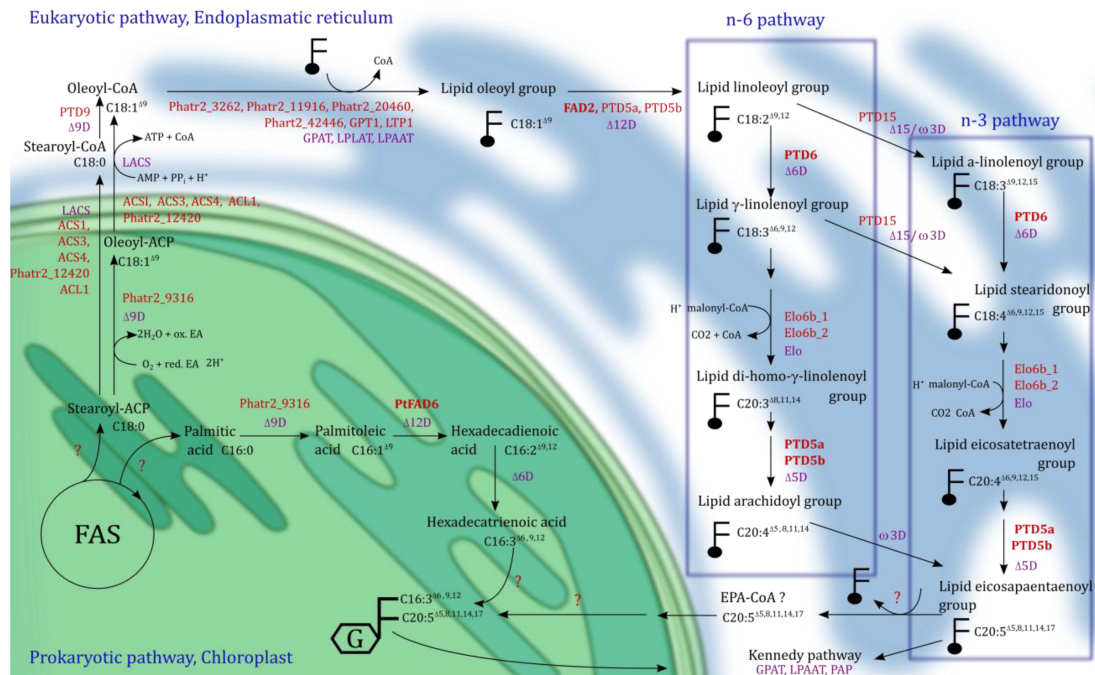


Figure 16 : Représentation schématique de la synthèse des acides gras et des VLC-PUFAs chez *Phaeodactylum*. La voie « prokaryote » est localisée dans le chloroplaste (en vert) et la voie « eucaryote » est située dans le réticulum endoplasmique (en bleu). Les gènes putatifs sont indiqués en rouge. (D'après Mühlroth et al., 2013).

L'entrée des acides gras dans la voie « eucaryote » est réalisée par hydrolyse de l'acyl-ACP par une thioestérase libérant un acide gras libre, thioestérifié sur un coenzyme A par une acyl-CoA synthase (ACS). Une seule thioestérase a été identifiée chez *Phaeodactylum* (PtTE – Phatr3_J33198) mais elle ne partage pas de similarités de séquence avec des thioestérases de plantes ou bactériennes. La surexpression de PtTE chez *Phaeodactylum* n'altère pas le profil des acides gras totaux mais provoque une augmentation de 72% des lipides totaux (Gong et al., 2011).

2.4.3. La synthèse des glycérolipides

2.4.3.1. La synthèse des glycérolipides chloroplastiques

Quatre classes de lipides sont présentes dans le chloroplaste : le MGDG, le DGDG, le SQDG et le PG (**Figure 17**). Ces quatre glycérolipides sont conservés dans les thylakoïdes des cyanobactéries jusqu'aux endosymbiontes secondaires (Botté & Maréchal, 2014, Boudière et al., 2014, Petroutsos et al., 2014, Bastien et al., 2016). La synthèse « procaryotique » des glycérolipides chloroplastiques commence par l'estérification d'un acyl, provenant d'un acyl-ACP en position *sn*-1 du squelette glycérol-3-phosphate par une glycérol-3-phosphate acyltransférase 1 (ATS1 : Phatr3_J3262) formant de l'acide lysophosphatidique. Un second groupement acyl est estérifié, en position *sn*-2, par une ATS2 formant de l'acide phosphatidique. Deux gènes codent pour la 1-acylglycérol-3-

phosphate acyltransférase chez *Phaeodactylum* (ATS2a : Phatr3_J11916 et ATS2b : Phatr3_J43099).

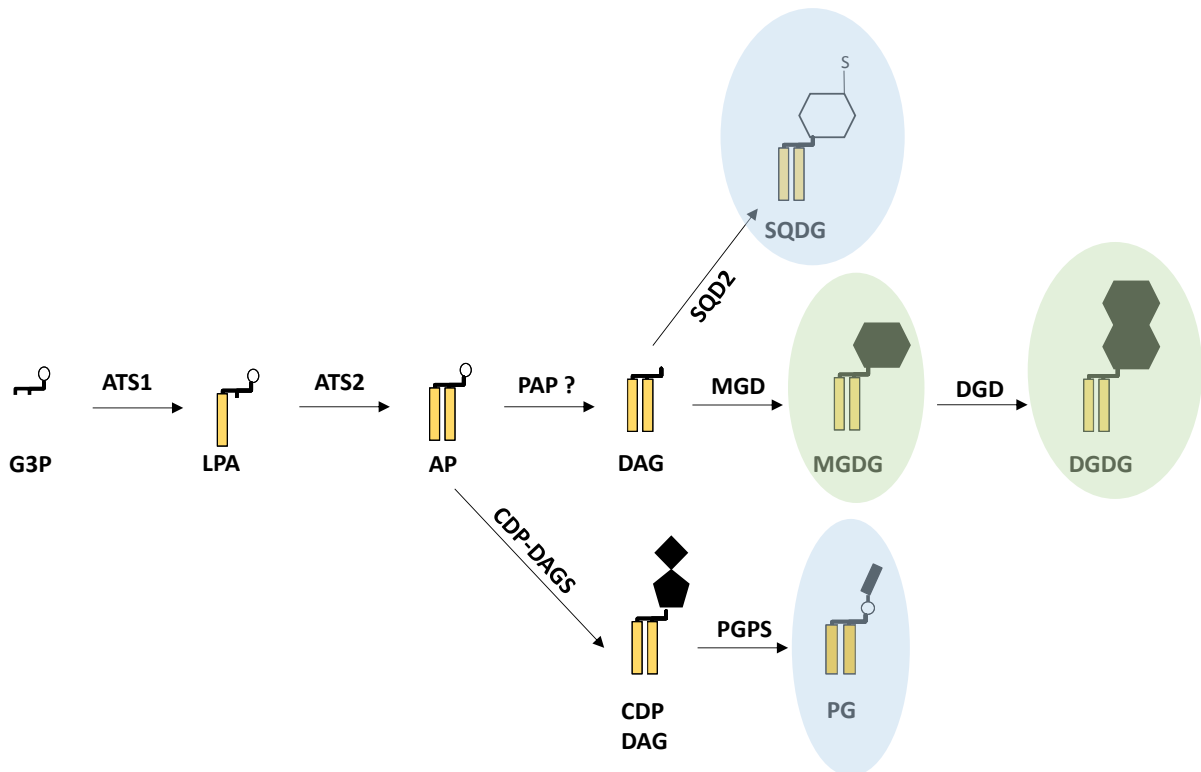


Figure 17 : Voie de synthèse « procaryotique » des glycérolipides chloroplastiques. G3P, glycérol-3-Phosphate ; LPA, acide lyso-phosphatidique ; AP, acide phosphatidique ; DAG, diacylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; PG, phosphatidylglycérol ; ATS1, glycérol-3-phosphate acyltransférase 1 ; ATS2, 1-acylglycérol-3-phosphate-acyltransférase ; PAP, Phosphatidate phosphatase ; MGD, monogalactosyldiacylglycérol synthase ; DGD, digalactosyldiacylglycérol synthase ; SQD2, UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransférase. Les cercles bleus indiquent les glycérolipides anioniques et les cercles verts indiquent les glycérolipides neutres. Les hexagones noirs représentent un galactose, un hexagone blanc représente un sulfoquinovose. Les rectangles jaunes schématisent les acides gras.

A partir de l'acide phosphatidique, deux voies sont possibles :

- La synthèse de CDP-DAG par une CDP-DAG synthase plastidiale (CDP-DAGS : Phatr3_J7678) qui substitue la tête polaire de l'AP par une cytidine diphosphate (CDP). Le CDP-DAG est converti en phosphatidylglycérol par une phosphatidylglycérol-phosphate synthase (PGPS : Phatr3_J8663).
- La synthèse de DAG par une phosphatidate phosphatase plastidiale (PAP).

Le DAG est ensuite le précurseur de la synthèse du SQDG et du MGDG. La formation du SQDG est effectuée en plusieurs étapes :

- Formation d'UDP-glucose à partir de glucose-1-phosphate et d'UTP dans une réaction catalysée par une UDP-glucose pyrophosphorylase (UDPG : Phatr3_J23639).

Données Bibliographiques - Partie 1

- Formation d'UDP-sulfoquinovose par condensation de l'UDP-glucose avec une molécule de sulfite (SO_3^{2-}). La réaction est catalysée par une UDP-sulfoquinovose synthase (SQD1 – Phatr3_J21201)
- Transfert du sulfoquinovose sur le DAG par l'UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransférase (SQD2). Quatre gènes codent pour des UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransférases putatives (SQD2 : Phatr3_J50356, SQD2-Like-A : Phatr3_EG02454, SQD2-Like-B : Phatr3_J54068 et SQD2-Like-C : Phatr3_J22554).

La synthèse du MGDG est catalysée par les MGDG synthases (MGDs). Ces enzymes transfèrent un galactose provenant de l'uridine diphosphogalactose (UDP-Gal) sur le DAG (Douce, 1974). Trois gènes codent pour des MGDG synthases chez *Phaeodactylum* (MGD1, Phatr3_J54168 ; MGD2, Phatr3_J9619 et MGD3, Phatr3_J14125). La formation du DGDG est catalysée par les DGDG synthases (DGDs), par l'ajout d'un deuxième galactose provenant d'une molécule d'UDP-Gal. Quatre gènes codent pour des DGDG synthases putatives (DGD1, Phatr3_J12884 ; DGD2, Phatr3_J2215 ; DGD-Like-A, Phatr3_J11390 et DGD-Like-B, Phatr3_J43116) chez *Phaeodactylum* (Petroutsos et al., 2014).

<i>sn-1/sn-2</i>	MGDG	DGDG	SQDG	PG
14:0/16:0			6,9	
14:0/16:1			16,5	
16:0/16:0			4,6	
16:1/16:0	5,2	8,7	23,9	31,7
16:1/16:1	6,5	14,1		4,9
16:1/16:2		5,4		
16:1/16:3	7,9			
16:1/18:1	5,4			
16:1/24:0			9,7	
16:2/16:0			9,6	
16:2/16:3	10,5			
18:0/16:3	7,7			
20:5/16:0		6,6	9,4	11,2
20:5/16:1		16,1		48,5
20:5/16:2	5,1	34,3		
20:5/16:3	19,1	7,3		
20:5/16:4	7,4			

Tableau 4 : Composition en acides gras des glycérolipides chloroplastiques de *Phaeodactylum*. Le tableau ne présente que les espèces moléculaires représentant au minimum 5% du glycérolipide considéré. (Modifié d'après Abida et al., 2015).

Le **Tableau 4** présente les principaux couples d'acides gras composant les glycérolipides chloroplastiques chez *Phaeodactylum* (Abida et al., 2015). Pour le MGDG, le couple 20:5/16:3 constitue l'espèce moléculaire la plus abondante. Le 16:3 est un acide gras marqueur du MGDG que l'on retrouve uniquement en position *sn*-2. Le DGDG est quant à lui marqué par la présence unique d'acides gras à 16 carbones en position *sn*-2. Le couple majoritaire au sein du SQDG est le 16:1/16:0. Près de la moitié du PG est retrouvé sous la forme 20:5/16:1.

2.4.3.2. La synthèse des triacylglycérols

Les triacylglycérols (trois acides gras de nature différentes estérifiés sur le squelette glycérol) s'accumulent sous la forme de gouttelettes lipidiques, entre autres, en cas de carence nutritionnelle et de stress abiotiques (Goold et al., 2015, Levitan et al., 2015, Abida et al., 2015, Dolch et al., 2017, Conte et al., 2018). Ce sont des glycérolipides hautement hydrophobes. La synthèse des TAGs peut s'effectuer par deux grandes voies différentes au niveau du réticulum endoplasmique (voie « eucaryote ») :

- 1) Une voie dépendante de l'acyl-CoA communément appelé la voie de Kennedy.
- 2) Une voie indépendante de l'acyl-CoA impliquant la phosphatidylcholine (PC) comme donneur d'acyl.

2.4.3.2.1 La voie de Kennedy

La voie de synthèse dite de Kennedy (Weiss et al., 1960) correspond à une synthèse *de novo* des TAGs à partir d'acide gras issus du pool cytosolique des acyl-CoA (**Figure 18**). La voie de synthèse débute par une estérification du squelette glycérol-3-phosphate (G3P) avec un acyl-CoA par une glycérol-*sn*-3-phosphate acyltransférase (GPAT – Phatr3_J54709) formant de l'acide lyso-phosphatidique (LPA). Le LPA est de nouveau estérifié avec un acyl-CoA par une lysophosphatidate acyltransférase (LPAAT – Phatr3_J45551) formant l'acide phosphatidique (AP). L'AP est ensuite déphosphorylé par une acide phosphatidique phosphatase (PAP – Phatr3_J43773) produisant du diacylglycérol (DAG).

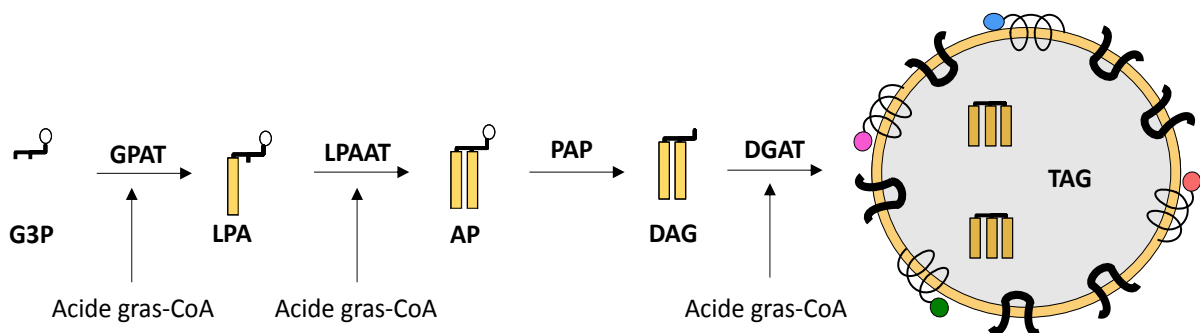


Figure 18 : Représentation schématique de la voie de synthèse de Kennedy. G3P, glycérol-3-phosphate ; LPA, acide lyso-phosphatidique ; AP, acide phosphatidique ; DAG, diacylglycérol ; TAG, triacylglycérol ; GPAT, glycérol-*sn*-3-phosphate acyltransférase ;

LPAAT, lysophosphatidate acyltransférase ; PAP, acide phosphatidique phosphatase ; DGAT, diacylglycérol acyltransférase. Les rectangles jaunes schématisent les acides gras. La dernière étape correspond à l'estérification d'un troisième acide gras sur le squelette glycérol par une diacylglycérol acyltransférase (DGAT) formant un triacylglycérol (TAG) (Zulu et al., 2018).

De nombreuses études récentes visent à caractériser fonctionnellement les différentes enzymes de cette voie de synthèse des TAGs. La surexpression de la GPAT chez *Phaeodactylum* provoque une augmentation de la quantité de lipides neutres (déterminée par marquage au Rouge de Nil) d'un facteur 2 ainsi qu'une plus grande proportion d'acides gras insaturés (Niu et al., 2016). Les GPAT correspondent aux activités enzymatiques les moins actives de la voie Kennedy (Liang & Jiang, 2013). Deux types de DGAT (DGAT1 et DGAT2) ont été décrits chez les diatomées (Guihéneuf et al., 2011, Niu et al., 2013, Gong et al., 2013, Cui et al., 2018). Le génome de *Phaeodactylum* code pour 1 isoforme de DGAT1 (PtDGAT1 – Phatr3_J9794) et 4 isoformes de DGAT2 (PtDGAT2A : Phatr3_J49462, PtDGAT2B : Phatr3_J49544, PtDGAT2C : Phatr3_J31662 et PtDGAT2D : Phatr3_J43469). PtDGAT1 contient au moins 8 domaines transmembranaires (Guihéneuf et al., 2011) et les isoformes de PtDGAT2 possèdent 1 à 4 domaines transmembranaires (Gong et al., 2013, Zulu et al., 2018). Deux études de génomique fonctionnelles ont été réalisées chez *Phaeodactylum* sur une DGAT de type 2. Une première étude décrit la surexpression de la PtDGAT2B chez *Phaeodactylum* provoquant une augmentation d'un facteur 2 des acides gras totaux (Niu et al., 2013). Une seconde étude a réalisée une surexpression de la PtDGAT2D provoquant une augmentation d'un facteur 1,4 de la quantité de TAG (Dinamarca et al., 2017).

Dans des conditions de culture riches en nutriments, les molécules de TAG de *Phaeodactylum* contiennent essentiellement des acides gras neo-synthétisés : 14:0/16:1/16:1 (6,5 %), 14:0/16:1/16:0 (9,3 %), 16:1/16:1/16:1 (11 %), 16:1/16:1/16:0 (23,5%), 16:1/16:0/16:0 (16 %), ainsi qu'une part d'acides gras ayant subit un processus d'élongation et de désaturation, *i.e.* 16:1/16:0/20:5 (5 %) (Abida et al., 2015, Dolch & Maréchal, 2015). Dans des conditions de carences nutritionnelles (azote ou phosphate), les molécules de TAG sont riches en 16:0 et 16:1 suggérant que la synthèse de TAG chez *Phaeodactylum* repose essentiellement sur un substrat DAG synthétisé par la voie Kennedy (Abida et al., 2015).

2.4.3.2.2. Une voie de synthèse impliquant la PC ?

L'hypothèse d'une voie alternative à la voie de Kennedy pour la synthèse des TAG provient de leur composition lipidique. Chez les plantes supérieures et la levure, Il existe une voie alternative à la voie de synthèse de Kennedy impliquant la PC (Fan et al., 2013a, Fan et al., 2013b). Cependant, il n'existe pas de démonstration de l'existence de cette voie chez les

Heterokonta. La PC peut-être hydrolysée en lysophosphatidylcholine (Lyso-PC) par une phospholipase A2 libérant un acide gras en position sn-2, puis être re-acylée par une acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransférase (LPCAT) en utilisant un autre acyl-CoA. Ce processus de désacylation / réacylation est appelé Cycle de Lands (Lands, 1958, Lands, 1960, Lands & Hart, 1965). Il n'implique pas la production nette de glycérolipide (Dolch & Maréchal, 2015). La phospholipid:diacylglycérol acyltransférase (PDAT) transfère un acide gras en position sn-2 de la PC vers la position sn-3 du DAG formant une molécule de TAG et de la Lyso-PC en coproduit (**Figure 19**) (Dahlqvist et al., 2000). Un gène codant pour la PDAT a été détecté chez *Phaeodactylum* (Phatr3_J8860) soulevant l'existence probable de cette voie de synthèse des TAG chez la diatomée (Zienkiewicz et al., 2016). On parle de voie de synthèse Acyl-CoA indépendante car la PC est utilisée comme donneur d'acyl pour la formation de TAG.

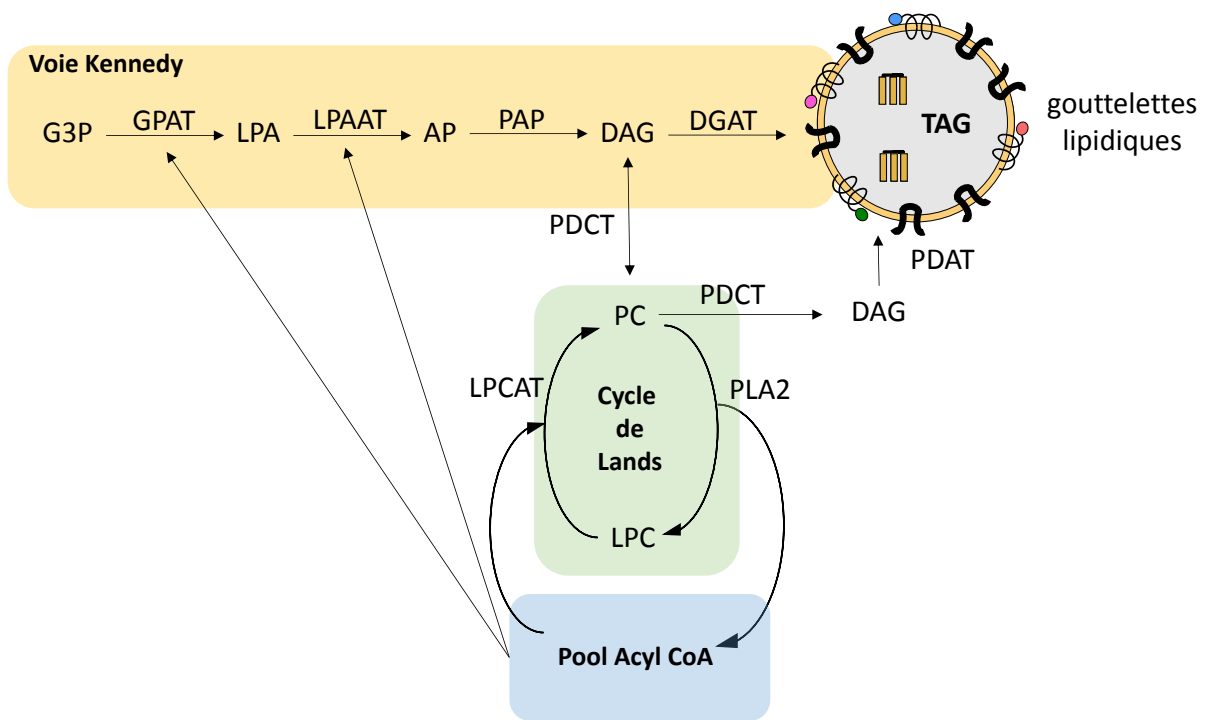


Figure 19 : Un modèle impliquant la PC pour la synthèse de TAG. Ce modèle est basé sur les travaux effectués chez les plantes supérieures. La voie de synthèse acyl-CoA dépendante (ou voie de Kennedy) est représentée en orange. La voie de synthèse acyl-CoA indépendante est représentée en vert. G3P, glycérol-3-phosphate ; LPA, acide-lyso phosphatidique ; AP, acide phosphatidique ; DAG, diacylglycérol ; TAG, triacylglycérol ; PC, phosphatidylcholine ; PDCT, phosphatidylcholine : diacylglycérol choline phosphotransférase ; PDAT, phospholipid:diacylglycérol acyltransférase ; LPCAT, acyl-CoA :lysophosphatidylcholine acyltransférase ; PLA2, phospholipase A2.

Partie 2 : Architecture des gouttelettes lipidiques à travers l'arbre du vivant

1. Les gouttelettes lipidiques au sein des cellules procaryotes

Les procaryotes sont définis comme des êtres vivants dont la structure cellulaire ne présente ni noyau, ni organites (à l'exception des thylakoïdes chez les cyanobactéries). La grande majorité des espèces bactériennes a la capacité d'accumuler des composés lipidiques au sein de leur cytoplasme, notamment lors de stress nutritionnel. Une distinction est effectuée chez les procaryotes selon les polymères lipidiques accumulés, avec soit des « gouttelettes lipidiques » (contenant des acyl esters fluides, les triacylglycerols, ou TAGs) soit des « granules » (contenant des lipopolymères semi-solide, les polyhydroxyalcanoates ou PHAs).

1.1. Les bactéries accumulatrices de polyhydroxyalcanoates (PHAs)

Les polyhydroxyalcanoates (PHAs) sont des polyesters produits par fermentation de composés lipidiques ou glucidiques. Ce sont des polyesters linéaires constitués de monomères d'hydroxy-acides (HA) reliés entre eux par une liaison ester (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016) (**Figure 20**). Les PHAs incluent notamment le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) et le polyhydroxyvalérate (PHV). Les PHAs sont également divisés en deux groupes selon le nombre de carbones par monomère : les PHAs à courte chaîne (3 à 5 carbones) et les PHAs à moyenne chaîne (6 à 14 carbones) (Philip et al., 2007).

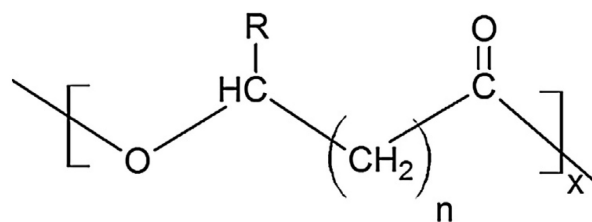


Figure 20 : Structure chimique des Polyhydroxyalcanoates (PHAs). R correspond à la chaîne latérale alkyle, n varie de 1 à 4 et x varie de 100 à 300000 (D'après Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Les PHAs sont synthétisés lorsque le rapport C/N est altéré (une carence en azote couplée à une trop forte présence de carbone) provoquant un arrêt de la croissance et de la division bactérienne résultant en une entrée en phase de quiescence (Schlegel et al., 1961). Les PHAs sont synthétisés dans des corps sphériques insolubles et cytosoliques, généralement appelés granules ou carbonosomes car ils sont composés de lipopolymères semi-solides (Jendrossek, 2009). Une attention particulière est apportée à ces polyesters depuis plusieurs dizaines d'années car ce sont des polymères biodégradables totalement indépendants des sources pétrolières (Pötter & Steinbüchel, 2006). Les PHAs sont utilisés dans un grand

nombre de secteurs d'activités comme le milieu médical comme matériaux résorbables (implants, sutures biodégradables, stent, etc.), l'industrie des matériaux (revêtement de papier, gel à mémoire de forme, etc.), l'industrie des carburants (additifs) et en biotechnologie (régulateurs métaboliques) (Asrar & Gruys, 2002, Anderson & Dawes, 1990, Williams & Martin, 2002, Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Ralstonia eutropha H16 (nouveau nom : *Cupriavidus necator*) constitue le modèle d'étude des granules de PHB (Reinecke & Steinbüchel, 2009). *R. eutropha* a été isolée dans une source à Göttingen (Schlegel et al., 1961). Ce modèle est une bactérie Gram négative pouvant accumuler 10 à 20 granules par cellule, mesurant 500 nm de diamètre et représentant 90% du poids sec (Anderson & Dawes, 1990) (**Figure 21**). Ces granules de PHAs présentent à leur surface des protéines indispensables à leur synthèse et à leur dégradation. Une étude récente a, par ailleurs, montré que les granules de PHB de *R. eutropha* H16 ne présentaient pas de monocouche de lipides polaires, mais uniquement des protéines superficielles (Bresan et al., 2016). Les protéines majeures détectées à la surface des granules de PHB de *R. eutropha* H16 sont une PHB synthase (*PhaC*), une Phasin (*PhaP*), une PhaR (*PhaR*) et une PHB dépolymérase (*PhaZ*).

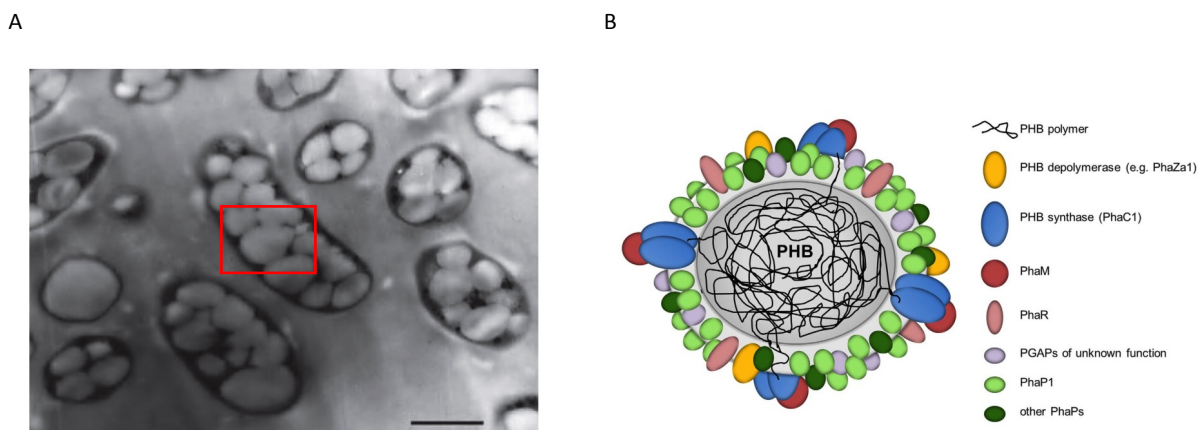


Figure 21 : Granules de PHB de *R. eutropha* H16. A. Micrographie électronique d'une coupe ultra-fine de *R. eutropha* H16. Un granule de PHA est encadré en rouge. Barre d'échelle : 1 µm (D'après Pötter & Steinbüchel, 2006). B. Modèle d'un granule de PHB de *R. eutropha* H16. La couche superficielle présente uniquement des protéines. Les protéines représentées sont confirmées à la surface des granules de PHB par l'analyse de fusions à des protéines fluorescentes. (D'après Bresan et al., 2016).

Le gène *PhaC* de *R. eutropha* H16 a été cloné par trois laboratoires indépendants (Peoples & Sinskey, 1989, Schubert et al., 1988, Slater et al., 1988). La localisation de la PHB synthase à la surface des granules a été confirmée par marquage immunocytochimique à l'or colloïdal (Gerngross et al., 1993). Les PHA synthases sont divisées en quatre classes :

- PHA synthase de classe I : une seule sous-unité (*PhaC*) d'un poids moléculaire se situant entre 60 et 70 kDa (*R. eutropha* H16) (Dennis et al., 1998).

- PHA synthase de classe II : une seule sous unité (Pha C1 ou Pha C2) (*Pseudomonas sp.*) (Tariq et al., 2015).
- PHA synthase de classe III : hétérodimère (PhaC/PhaE) de 40 kDa par sous-unité (*Allochrocatium vinosum*) (Han et al., 2007).
- PHA synthase de classe IV : hétérodimère (PhaC/PhaR) de 20 kDa par sous-unité (*Bacillus cereus*) (Tariq et al., 2015).

Une autre protéine identifiée à la surface du granule de PHB de *R. eutropha* H16 est la phasine (Wieczorek et al., 1995). Son nom provient d'une analogie avec les oléosines que nous décrivons plus tard chez les *Viridiplantae*. Le mutant *PhaP* présente une diminution d'accumulation de PHB avec un unique granule géant alors que la surexpression de *PhaP* conduit à la synthèse d'un grand nombre de petits granules (Wieczorek et al., 1995). L'expression de *PhaP* dans des bactéries accumulatrices de TAG (*Rhodococcus opacus* PD630 et *Mycobacterium smegmatis* mc²155) conduit à la liaison de la phasine à la surface des gouttelettes lipidiques (Hänisch et al., 2006). L'expression de *PhaP* est régulée par le répresseur *PhaR*. La PHB dépolymérase (*PhaZ*) est impliquée dans la dégradation des granules de PHA en Hydroxybutyryl-CoA fournissant une source de carbone et d'énergie pour la bactérie (Murphy, 2012).

Une étude protéomique des granules de PHB a été également réalisée chez ce modèle. Les auteurs ont identifié 404 protéines à la surface des granules incluant plusieurs phasines (*PhaP1*, *PhaP2*, *PhaP3*, *PhaP4*), la PHB synthase (*PhaC1*), *PhaR* et la PHB dépolymérase (*PhaZa1*) (Jendrossek & Pfeiffer, 2014). Afin d'éliminer un maximum de contaminants, cette même équipe a réalisé un protéome comparatif entre les fractions solubles et membranaire (Sznajder et al., 2015). Les auteurs ont identifié 268 protéines dans la fraction des granules de PHB, dont 12 sont uniquement présentes dans cette fraction (dont 6 phasines et la PHB dépolymérase). Les auteurs ont ainsi identifié 4 nouvelles protéines, dont la localisation a été confirmée grâce à des fusions avec la eYFP, associées aux granules de PHB de *R. eutropha* H16 : une patatin-like phospholipase (A0225), une protéine hypothétique (A2001) et deux α/β hydrolases (A0671 et B1632). L'étude génétique des simples mutants Δ A0671 et Δ B1632 et du double mutant Δ A0671 Δ B1632 révèle une légère diminution de l'accumulation de PHB par rapport au témoin.

Un protéome de la gouttelette lipidique a été également réalisé chez la β -protéobactérie *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (Tirapelle et al., 2013). Les auteurs ont notamment identifié par spectrométrie de masse MALDI-TOF la PHB synthase (*PhbC1*), la PHB dépolymérase (*PhaZ1*), la phasine (*PhaP1*), le régulateur *PhbF* ainsi qu'une histone like-protein HC2. Les auteurs montrent, par génie génétique, que la synthèse de PHB est altérée

chez le mutant *phbC1* et que le protéome des granules de PHB du mutant *phaP1* est recouvert principalement par la phasine PhaP2.

1.2. Les bactéries accumulatrices de triacylglycérols (TAGs) et de cérides (Wax esters)

Les bactéries sont également capables d'accumuler des triacylglycerols sous forme de gouttelettes lipidiques. On peut relever les espèces bactériennes des genres *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Micromonospora*, *Dietzia* et *Gordonia* ainsi que plusieurs streptomycètes (Alvarez & Steinbüchel, 2002, Wältermann & Steinbüchel, 2005, Murphy, 2012). Les γ -protéobactéries (*Marinobacter*, *Alcanivorax*,...) sont des bactéries hydrocarbonoclastiques capables d'accumuler également des gouttelettes lipidiques (TAGs + cérides) lors de l'entrée en phase de dormance lorsque les conditions de développement ne sont plus favorables (Kalscheuer et al., 2007). Ces γ -protéobactéries sont souvent rencontrées dans les océans associées à des microalgues dans un système appelé la phycosphère (Lupette et al., 2016). Ces bactéries sont également capables d'utiliser les hydrocarbures pétroliers comme source de carbone soulevant une application possible dans la dégradation des hydrocarbures lors de marées noires (Harayama et al., 2004, Murphy, 2012).

Les *Rhodococcus* sont des bactéries oléagineuses contenant de larges quantités de triacylglycérols (Alvarez, 2016). Des études protéomiques de la gouttelette lipidique de plusieurs espèces de *Rhodococcus* ont été réalisées : *Rhodococcus opacus* et *Rhodococcus ruber* (Kalscheuer et al., 2001), *Rhodococcus jostii* RHA1 (Ding et al., 2012) et *Rhodococcus opacus* PD630 (Chen et al., 2014) (**Figure 21**). 228 protéines ont été identifiées chez *R. jostii* RHA1 incluant deux protéines structurales putatives représentant 15% des protéines de la gouttelette lipidique : la Microorganism Lipid Droplet Small (MLDS) et la Phage shock protein A (Psp A). Des ribosomes et des régulateurs translationnels ont été également isolés dans le protéome de la gouttelette lipidique de *R. jostii* RHA1 (Ding et al., 2012). Par une étude de génétique fonctionnelle, les auteurs montrent que la délétion de la MLDS provoque la formation de gouttelettes lipidiques plus grandes (Ding et al., 2012). Une étude récente de la même équipe a par ailleurs montré que les gouttelettes lipidiques de *Rhodococcus Jostii* RHA1 se liaient à l'ADN génomique *via* la protéine MLDS, ce qui augmente le taux de survie des cellules bactériennes lors d'une carence nutritionnelle ou d'un stress génotoxique (Zhang et al., 2017). Les auteurs montrent également que l'expression de MLDS est régulée par MLDSR, un régulateur transcriptionnel séquestré dans la gouttelette et se liant au promoteur et au terminateur de l'opéron.

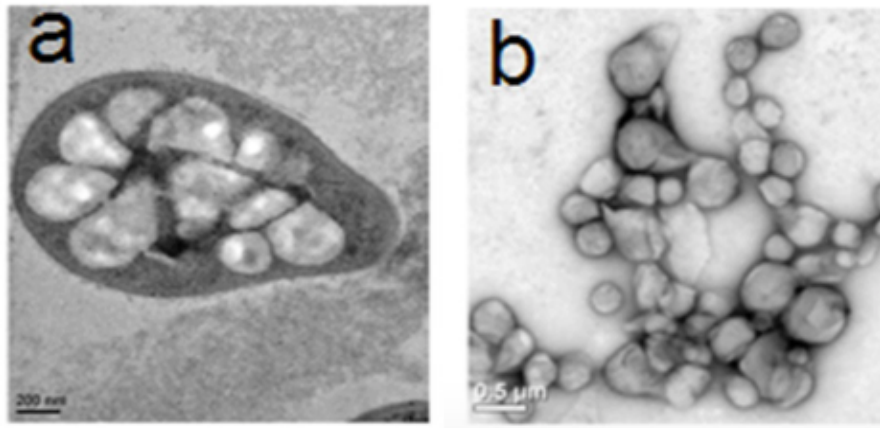


Figure 22 : Gouttelettes lipidiques de *Rhodococcus jostii* RHA1. a : Section ultra-fine de *R. jostii* RHA1 observée par microscopie électronique. Barre d'échelle : 0,2 μm. b. Coloration négative de gouttelettes lipidiques après purification. Barre d'échelle : 0,5 μm. (D'après Ding et al., 2012).

1.3. Les bactéries pathogènes

Les bactéries ne sont pas seulement capables de synthétiser des gouttelettes lipidiques, elles peuvent également détourner la machinerie lipidique d'un hôte en l'infectant pour en tirer des bénéfices. Ce paragraphe vise à présenter des exemples connus de détournement du métabolisme lipidique par des bactéries pathogènes.

Les mycobactéries sont des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) possédant un pouvoir pathogène : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium avium* sont des agents responsables de la tuberculose, *Mycobacterium leprae* est l'agent de la lèpre et *Mycobacterium ulcerans* est responsable de l'ulcère de Buruli. Les mycobactéries sont capables de perturber l'homéostasie lipidique humaine pendant l'infection suite à la formation de macrophages spumeux contenant des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme (Kim et al., 2010, Caire-Brändli et al., 2014). Les gouttelettes lipidiques produites dans les cellules infectées servent de plateforme de production de molécules lipidiques de signalisation (prostaglandines et leucotriènes eicosanoïdes) régulant la réponse immunitaire et l'inflammation. Les leucotriènes eicosanoïdes pourraient notamment diminuer la réponse immunitaire de l'hôte favorisant la survie du pathogène (Melo & Weller, 2016). Un élément indispensable pour la survie des *Mycobactérium* dans les macrophages est la présence de fer. Les gouttelettes lipidiques servent également à concentrer et à délivrer le fer *via* des sidérophores lipophiles (mycobactines) sécrétés par la bactérie (Luo et al., 2005).

Le protéome de la gouttelette lipidique du bacille de Calmette et Guérin (souche atténuée hypoxique non répliquante de *Mycobactérium bovis* – BCG) utilisé dans le vaccin contre la tuberculose a permis l'identification de cinq protéines : deux triacylglycérol synthases, Tgs1 (BCG3153c) et Tgs2 (BCG3794c) ainsi que trois autres protéines BCG1169c, BCG1489c et BCG1721 (Low et al., 2010). Les auteurs ont réalisé des mutants KO pour *tgs1*, *tgs2*,

BCG1169c et *BCG1489c* ainsi que les souches complémentées respectives. *BCG1169c* est une protéine propre au *Mycobacterium* car elle n'a pas été retrouvée chez d'autres procaryotes et eucaryotes. *BCG1489c* code pour une AGPAT putative impliquée dans la formation de l'acide phosphatidique dans la voie de Kennedy. Une délétion de *BCG1489C* provoque une diminution de la quantité de TAG. Les auteurs ont également caractérisé *BCG1721* comme une enzyme bi-fonctionnelle (domaine lipase et ACSL dans les régions N et C terminal).

Chlamydia trachomatis est une bactérie intracellulaire obligatoire responsable de la chlamydie (infection sexuellement transmissible) ainsi que de maladies oculaires. Cette bactérie possède un cycle de vie biphasique : le corps élémentaire (CE) représentant une forme de vie inerte et stable et le corps réticulé (CR) métaboliquement actif (Belland et al., 2004). *C. trachomatis* est capable de transloquer une gouttelette lipidique du cytoplasme de l'hôte vers la lumière de la vacuole parasitophore contenant la bactérie via un processus d'endocytose. (Cocchiario et al., 2008). Les gouttelettes lipidiques sont étiquetées, dans un premier temps, par une famille de protéines Lda (Kumar et al., 2006). Ces gouttelettes lipidiques étiquetées sont ensuite reconnues, par des protéines de la membrane de la vacuole parasitophore, qui commence à s'invaginer. Les CR finissent par s'associer à la gouttelette lipidique. Ce mécanisme a été également observé *in vivo* chez la souris infectée par *Chlamydia muridarum* (Rank et al., 2011). Le protéome de la gouttelette lipidique de cellules épithéliales d'adénocarcinome cervical humain HeLa CCL2 infectées par *C. trachomatis* LGV-L2 434/Bu est enrichi pour les protéines PLIN2, PLIN3, ACSL-3, ACSL-4 impliquées dans le métabolisme des lipides (Saka et al., 2015).

Un dernier exemple concerne *Orientia tsutsugamushi*, une bactérie responsable du typhus des broussailles (ou fièvre fluviale du Japon). Des cellules fibroblastiques de souris L-929 infectées par cette bactérie présentent une augmentation de la synthèse des TAGs ainsi que du nombre de gouttelettes lipidiques (Ogawa et al., 2014).

2. « Détournement » des gouttelettes lipidiques par des virus

Nous avons vu précédemment que les bactéries pathogènes détournent une partie des gouttelettes lipidiques de cellules hôtes. Ces gouttelettes peuvent aussi constituer un centre réactionnel de stockage d'énergie indispensable pour la dispersion de virus.

Le virus de l'hépatite C (VHC) constitue le modèle le plus utilisé pour étudier le détournement des gouttelettes lipidiques. Le VHC est un virus à ARN simple brin positif de 9,6 kB et mesurant 60 nm. Le cycle de vie du VHC est intéressant car il est lié au métabolisme lipidique de l'hôte. Le virion circule initialement sous une forme de

lipoviroparticule (riche en cholestérol esters et apolipoprotéines apoB et apoE) dans le sang des patients infectés (Thomssen et al., 1992, Nielsen et al., 2006, Nielsen et al., 2008). Dans un second temps, l'entrée du virus est dépendante de récepteurs LDL (*Low density Lipoproteins*). La réplication de l'ARN viral induit ensuite des altérations extensives de la membrane et la formation de structures vésiculaires qui présentent des caractéristiques similaires à des radeaux lipidiques (Aizaki et al., 2004). L'assemblage du VHC nécessite la localisation de certaines protéines du VHC au niveau des gouttelettes lipidiques de l'hôte, et la libération de virions est fortement associée à la voie de sécrétion des lipoprotéines de très basse densité (VLDL). La capsidite du VHC et la protéine non structurale du complexe de réplication virale NS5A sont localisées au niveau de la gouttelette lipidique (Miyanari et al., 2007). Il a été également montré que DGAT1 interagissait avec les protéines de la capsidite du VHC et NS5A pour faciliter leur recrutement (Herker et al., 2010, Camus et al., 2013).

Le virus de la dengue (DENV) est un virus à ARN positif simple brin d'environ 11 kb transmis par le moustique *Aedes aegypti*. La capsidite protéique du DENV est localisée au niveau des gouttelettes lipidiques durant l'infection (Samsa et al., 2009, Carvalho et al., 2012). Samsa et al. évoquent une augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques pendant l'infection (Samsa et al., 2009). Cependant, il a été démontré que le DENV induisait une lipophagie (autophagie sélective) de la gouttelette lipidique permettant de rendre plus robuste la réplication des virus (Heaton & Randall, 2010). Cette même équipe a montré que la protéine NS3, en coopération avec la protéine Rab18 (Ras-related protein 18) interagissait avec la Fatty Acid Synthase de l'hôte (FASN) en la recrutant aux sites de réplication de l'ARN viral, stimulant ainsi la synthèse des acides gras (Heaton et al., 2010, Tang et al., 2014). Une étude complémentaire avait montré que le DENV perturbait l'homéostasie des lipides chez des cellules C6/36 d'*Aedes albopictus* infectées (Perera et al., 2012).

Le poliovirus (PV) est un virus à ARN positif simple brin d'environ 7,5 kb responsable de la poliomyélite. Une infection par le poliovirus induit une augmentation de la synthèse des acides gras à longues chaînes, *via* ACSL-3 (Nchoutmboube et al., 2013). Les acides gras dans les cellules infectées par le PV sont directement utilisés pour la synthèse de PC riche en 16:0 rendant ainsi les membranes plus fluides. Cet import des acides gras implique également la protéine 2A du PV. La synthèse de PC semble être une caractéristique commune aux virus à brin d'ARN positif car le même type de résultat a été obtenu pour le DENV (Perera et al., 2012), le Flock House Virus (Castorena et al., 2010), le virus de la mosaïque du brome et le VHC (Zhang et al., 2016).

Les rotavirus (RV) constituent la première cause de gastro-entérite chez les nourrissons et les jeunes enfants (Parashar et al., 2006). Les RV sont des virus à ARN bicaténaire non enveloppés de structures icosaédriques. La réplication de l'ARN viral du RV s'effectue dans

le viroplasma. Une équipe a notamment montré que le viroplasma colocalise avec deux protéines des gouttelettes lipidiques : la Perilipin (PLIN1) et ADRP (PLIN2) (Cheung et al., 2010). Le viroplasma recrute les gouttelettes lipidiques lors de l'infection et le nombre de complexes viroplasma-gouttelettes lipidiques augmente durant la réplication (Cheung et al., 2010). Ce résultat a été confirmé par l'analyse de lipidomes au cours de l'infection révélant une augmentation de la quantité totale de lipides dans des cellules rénales de singe M104 infectées par le RV RF strain (G6P6{1}) (Gaunt et al., 2013).

Il a été également montré que des protéines virales telles que la protéine de capsid externe $\mu 1$ des réovirus (Coffey et al., 2006) et l'agnoprotéine du polyomavirus BK (Unterstab et al., 2010) pouvaient interagir avec les gouttelettes lipidiques. L'ensemble de ces exemples montre l'importance des gouttelettes lipidiques comme source d'énergie pour le cycle de vie des virus au sein d'un hôte.

3. Les gouttelettes lipidiques au sein des cellules eucaryotes

Les eucaryotes regroupent les organismes unicellulaires et pluricellulaires caractérisés par la présence d'organites (réticulum endoplasmique, noyau, Golgi, trans-Golgi network, peroxisome, lysosome, vacuole – pour le système endomembranaire ; mitochondrie et chloroplaste pour les organites semi-autonomes), d'un cytosquelette et d'ADN porté par plusieurs chromosomes. Les cellules eucaryotes sont également capables de se diviser par mitose, de réaliser la reproduction sexuée et l'endocytose. Tout comme les procaryotes, les eucaryotes sont capables de synthétiser des gouttelettes lipidiques depuis le réticulum endoplasmique.

3.1. Les *Opisthokonta*

Les opisthokontes constituent un groupe monophylétique regroupant les métazoaires et les levures.

3.1.1. Les Métazoaires

Les métazoaires sont des eucaryotes hétérotrophes. Ils sont capables d'accumuler des gouttelettes lipidiques cytosoliques contenant des triacylglycérols et/ou des stérols esters. Les principaux résultats de protéomique ont été obtenus chez quelques modèles de métazoaires (*Mammalia* et *Arthropoda*).

3.1.1.1. Les *Mammalia*

3.1.1.1.1. Les périlipines sont les protéines majoritaires

Les gouttelettes lipidiques de mammifères sont composées d'un cœur hydrophobe constitué de triacylglycérols et de cholesteryl esters, considérés généralement comme une forme de

stockage. Une monocouche de lipides polaires limite la gouttelette principalement composée de phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) et de phosphatidylinositol (PI) (Bartz et al., 2007). Chez les mammifères, les protéines à la surface de la gouttelette lipidique sont regroupées en une famille appelée anciennement PAT (pour Perilipin - Adipophilin – Tail-interacting protein of 47 KDa) (Bickel et al., 2009) mais dont la nomenclature a évolué depuis 2010 sous le nom de PLIN (Kimmel et al., 2010) (**Tableau 5**)

Péripilines PLIN (<i>Ex</i> Protéines FAT)	
Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
Perilipin / PERI / LSD1	PLIN 1
ADRP / ADFP / LSD2	PLIN 2
TIP47 / PP17 / M6PRBP1	PLIN 3
S3-12	PLIN 4
PAT1 /MLDP / OXPAT / LDSP5	PLIN 5

Tableau 5 : Évolution de la nomenclature des péripilines chez les mammifères (D'après Kimmel et al., 2010).

La découverte de la PLIN1 en 1991 est à la base de l'intégralité des recherches sur les gouttelettes lipidiques (Greenberg et al., 1991). Péripiline dérive du grec περιλιππος signifiant « aux alentours des lipides » (Kimmel et al., 2010). Les isoformes de PLIN1 sont codées par un seul gène avec des homologies de séquences. PLIN1 présente en effet quatre variantes d'épissage PLIN1a, PLIN1b, PLIN1c et PLIN1d (Kimmel et al., 2010). L'architecture des péripilines est présentée dans la **Figure 23**. Elles sont constituées d'un premier domaine PAT hydrophobe de 100 acides aminés (en rouge) définissant la région N-terminale. L'étude d'un mutant PLIN2-N1 (déficient pour le domaine PAT) révèle que ce domaine n'est pas impliqué dans la liaison aux lipides, mais dans la stabilisation des gouttelettes lipidiques, l'accumulation des lipides et la dégradation de PLIN2 par le protéasome (Orlicky et al., 2008, Najt et al., 2014). Le domaine PAT est suivi d'un motif hélicoïdal 11-mers de taille variable (en bleu). La région hélicoïdale 11-mers est également présente sur des apolipoprotéines ou α -synucléine et pourrait interagir avec des phospholipides (Bussel & Eliezer, 2003). La PLIN4 présente une région 11-mers de 900 acides aminés qui se répètent. La région C-terminale présente plus de divergence structurale (en vert). La structure de la région C-terminale de la PLIN3 (TIP47) de souris a été résolue par cristallographie aux rayons X à 2,8 Å (Hickenbottom et al., 2004). Elle présente une forme en L. Les péripilines sont modifiées post-traductionnellement par des phosphorylations, *via* la PKA, lors de la lipolyse. Les sites de phosphorylation sont différents selon les variantes d'épissages pour la PLIN1 : PLIN1a (Ser⁸¹, Ser²²², Ser²⁷⁶, Ser⁴³³, Ser⁴⁹² et Ser⁵¹⁷), PLIN1b et PLIN1c (Ser⁸¹, Ser²²², Ser²⁷⁶), PLIN 1d (Ser⁸¹). PLIN2 est phosphorylée sur la Ser²⁹¹ et PLIN5 sur la Ser¹⁵⁵. PLIN3 et PLIN4 ne présentent pas de site de phosphorylation.

Données Bibliographiques – Partie 2

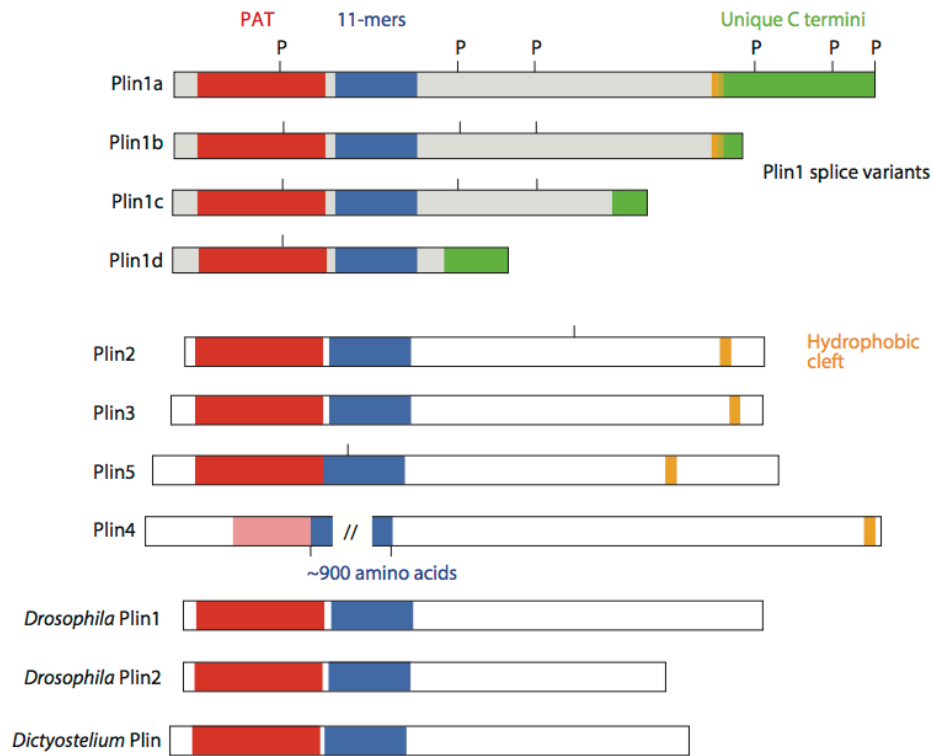


Figure 23 : Conservation de l'architecture des périlipines de mammifères, *Drosophila* et *Dictyostelium*. Le domaine PAT est représenté en rouge et le domaine 11-mers en bleu. Les sites de phosphorylation sont indiqués avec un P. (D'après Kimmel & Sztalryd, 2016).

Récemment, une équipe de recherche américaine a identifié un sixième clade de périlipine, appelé PLIN6, spécifique des téléostéens (Granneman et al., 2017). Fait intéressant, PLIN6 n'est pas exprimée dans les tissus associés au métabolisme lipidique mais dans les xanthophores (cellules pigmentaires) de la peau des téléostéens. Les auteurs montrent par des analyses biochimiques que PLIN6 est associée à la surface des gouttelettes riches en caroténoïdes. L'étude indique également que les gouttelettes lipidiques et les gouttelettes riches en caroténoïdes seraient des structures homologues. PLIN6 serait donc une protéine spécialisée dans la régulation des voies de synthèse des pigments.

Depuis le début des années 2000, au moins 25 études protéomiques de la gouttelette lipidique de cellules ou de tissus de mammifères ont été effectuées (**Tableau 6**). Ces études ont été réalisées sur des modèles courants dans les laboratoires de biologie : lignée cellulaire d'ovaires du hamster de Chine *Cricetulus griseus* (CHO K2), lignée cellulaire de souris (3T3-L1, C57BL/6, C2C12, CD1), de rats (INS-1 832/13, Sprague-Dawley), tissus lutéaux et globes oculaires bovins mais également des cellules humaines (HuH7, HepG2, Caco-2/TC7, A431, U937, SZ95). Le **Tableau 6** résume l'ensemble des principaux résultats obtenus dans ces études protéomiques. Dans l'ensemble de ces études, la protéomique révèle toujours la présence d'au moins une des cinq classes de PLIN à la surface de la

gouttelette lipidique des mammifères. Il n'existe pas à ce jour d'exception sur la présence de PLIN à la surface des gouttelettes lipidiques de cellules ou de tissus de mammifères. On peut notamment constater que la répartition des PLIN varie selon les cellules et les tissus de mammifères. PLIN1 et PLIN4 sont essentiellement présentes à la surface des gouttelettes lipidiques des adipocytes (Brasaemle et al., 2004, Cho et al., 2007, Blouin et al., 2010, Ding et al., 2012) et du tissu adipeux (Kanshin et al., 2009, Yu et al., 2015). PLIN2 et PLIN3 sont ubiquitaires dans les tissus non adipeux. PLIN2 est fortement exprimée à la surface des gouttelettes lipidiques du foie et des hépatocytes (**Tableau 6**). PLIN5 est présente essentiellement au niveau des tissus oxydatifs c'est-à-dire le cœur, le tissu adipeux brun et les muscles squelettiques (Yamagushi et al., 2006, Wolins et al., 2006, Dalen et al., 2007, Kimmel & Sztalryd, 2014).

Des études fonctionnelles des PLIN ont été réalisées, en amont et en aval, des études protéomiques. Des souris KO pour la PLIN1 (Plin1 $-/-$) présentent un phénotype de réduction de la masse grasseuse, une augmentation de l'activité lipolytique, mais également une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline périphérique (Martinez-Botas et al., 2000, Tansey et al., 2001). La stimulation de l'activité lipolytique par le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) avait montré, dans une première étude, une diminution de l'expression des périlipines A et B (PLIN1). Cependant, la surexpression de la périlipine A et B (PLIN1) bloque la capacité du facteur TNF- α à augmenter la lipolyse dans les cellules 3T3-L1 (Souza et al., 1998). Des souris KO pour l'adipophilin (ADFP appelé désormais PLIN2) présentent une différenciation adipeuse inchangée, une diminution de 60% des TAGs hépatiques mais un niveau de VLDL identique aux souris témoins suggérant une rétention des TAGs dans les microsomes (Chang et al., 2006). Une surexpression de l'Adipose Differentiation Related Protein (ADRP appelé désormais PLIN2) fusionnée à la GFP provoque une augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes (Inamura et al., 2002). Une première étude antisens de l'ADRP hépatique (PLIN2) provoque une diminution de la stéatose hépatique, de l'hypertriglycéridémie et une résistance à l'insuline chez des souris obèses sans altérer le niveau d'expression de TIP47 (PLIN3) et S3-12 (PLIN4) (Imai et al., 2007). Une deuxième étude antisens de l'ADRP (PLIN2) montre le même type de résultat avec une diminution des DAG et TAG dans le foie ainsi qu'une amélioration de l'action de l'insuline (Varela et al., 2008). Enfin, une délétion de l'exon 5 de PLIN2 (Plin2 Δ 5) chez des souris provoque une résistance à une obésité induite par un régime alimentaire riche en graisses soulevant le rôle de PLIN2 dans les mécanismes de l'obésité et de la stéatose hépatique (McManaman et al., 2013). Une délétion de la PLIN3 induit chez des souris une tolérance au froid (Lee et al., 2018). Les auteurs concluent que la PLIN3 est impliquée dans la régulation de la formation des adipocytes beiges et des activités thermogéniques. La délétion de PLIN4 entraîne une diminution d'expression de PLIN5 réduisant l'accumulation

de lipides dans le muscle cardiaque (Chen et al., 2013). Un KO de PLIN6 est responsable d'un arrêt de la concentration des caroténoïdes dans les gouttelettes (Granneman et al., 2017).

3.1.1.1.2. Les périlipines sont régulées transcriptionnellement par les récepteurs PPAR

L'expression des périlipines (à l'exception de la PLIN3) chez les mammifères est régulée par une famille de facteur de transcription, les récepteurs PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Ces facteurs de transcription sont activés par la liaison de ligands lipidiques (Mandard et al., 2004, Poulsen et al., 2012). Trois types de PPAR ont été identifiés :

- PPAR α exprimée dans le foie, les reins, les muscles, le cœur et les tissus adipeux.
- PPAR β/δ exprimée dans le cerveau, le tissu adipeux et la peau.
- PPAR γ : l'isoforme $\gamma 1$ est exprimée ubiquitairement, $\gamma 2$ est exprimé dans les tissus adipeux et $\gamma 3$ dans les macrophages.

Les PPAR sont des récepteurs nucléaires divisés en quatre régions : une région A/B en N-terminal possédant une fonction trans-activatrice, une région C de liaison à l'ADN (DBD pour *Domain Binding DNA*), une région D charnière (*Hinge*) et une région E/F de liaison du ligand (LBD pour *Ligand Binding Domain*) (**Figure 24**).

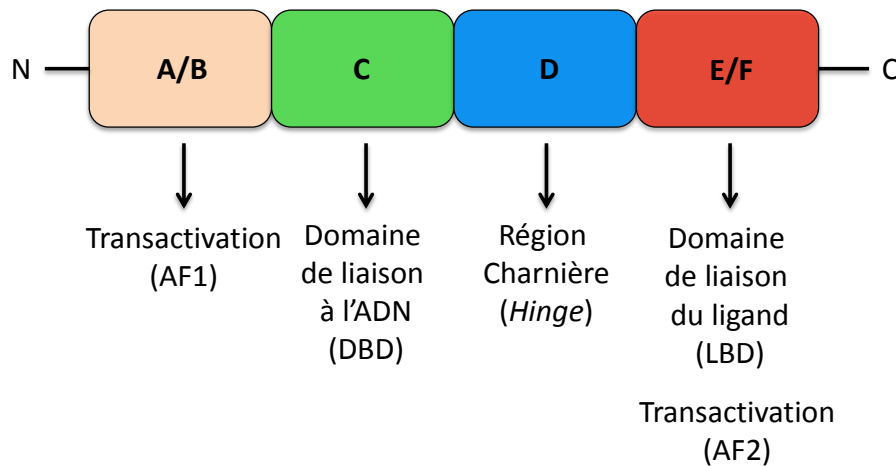


Figure 24 : Structure des récepteurs nucléaires PPAR.

Fonctionnellement, les PPAR activent la transcription de leurs gènes cibles en formant un hétérodimère avec le récepteur X du rétinoïde nucléaire (RXR). L'hétérodimère se fixe ensuite sur une séquence consensus AGGTCANAGGTCA (où N est un nucléotide) de l'ADN, appelée PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) localisée fréquemment

dans la région promotrice du gène. La fixation du ligand entraîne un changement de conformation du LBD.

L'expression des périlipines (à l'exception de PLIN3) est activée différenciellement par PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ favorisant une réponse sélective dans les tissus lors de la biogenèse ou de la dégradation des gouttelettes lipidiques. L'expression de PLIN1 et PLIN4 est activée transcriptionnellement dans le tissu adipeux blanc par la liaison de PPAR γ à leurs promoteurs. L'expression de PLIN2 est régulée par PPAR α (Targett-Adams et al., 2005, Dalen et al., 2006, Edvardsson et al., 2006) et PPAR β/δ (Chawla et al., 2003, Schmuth et al., 2004, Tobin et al., 2006). L'expression de PLIN5 est préférentiellement régulée par PPAR β/δ dans le muscle squelettique (Bindesbøll et al., 2013).

Il existe également d'autres facteurs régulant les périlipines dans les cellules de mammifères. Le Liver X receptor α (LXR- α) est capable de supprimer l'expression de PLIN1 dans le tissu adipeux blanc (Stenton et al., 2011). Sous l'action de statines, SREBP2 (*Sterol regulatory element-binding protein-2*), une protéine régulatrice du métabolisme du cholestérol, peut aussi inhiber PLIN5 (Langhi et al., 2014).

Données Bibliographiques – Partie 2

Cellules	Références	Modèle d'étude	Nombre de protéines identifiées	Principales Protéines identifiées	Étude fonctionnelle
Fibroblaste	Liu et al., 2004	lignée cellulaire des ovaires du hamster de Chine CHO K2	37 protéines	ADRP (PLIN2) / S3-12 (PLIN4) / Petites GTPases / protéine 14-3-3 / métabolisme des lipides	Non
	Bartz et al., 2007		125 protéines	ADRP (PLIN2) / Protéines Rab / Calnexin / CGI-58 / CGI-49 / HSP / Sec22p / Caveolin-1	Non
Adipocyte	Brasaemle et al., 2004	pré-adipocytes 3T3-L1 de souris	28 protéines en condition basale et 39 protéines en condition <i>lipidique</i>	Perilipin (PLIN1) / ADRP (PLIN2) / TIP47 (PLIN3) / S3-12 (PLIN4) / CGI-58 / CGI-49 / CNX	Non
	Cho et al., 2007	pré-adipocytes 3T3-L1 de souris	28 protéines	Perilipin (PLIN1) / TIP47 (PLIN3) / HSL / Protéines Rab / ACSL4 / PRP19	RNAi de Prp19
	Blouin et al., 2010	adipocytes 3T3-L1 de souris	11 protéines absentes dans la lignée cellulaire Cav1-KO	Annexin A1 / Actin / Myosin / ATP synthase / Polymerase I	Lignée cellulaire de souris Cav1-KO
	Ding et al., 2012	Souris femelle C57BL/6	193 protéines	Perilipin (PLIN1) / S3-12 (PLIN4) / métabolisme des lipides / HSP / 14-3-3 / Cytosquelette / Caveolin / Protéines Rab / Histones	Non
Hépatocyte	Fujimoto et al., 2004	Lignée cellulaire d'hépatome humain HuH7	17 protéines	ADRP (PLIN2) / TIP47 (PLIN 3) / CGI-49 / petites GTPases / Annexin II / ACS4	Non
	Sato et al., 2006	Lignée cellulaire d'hépatome humain HepG2 exprimant le VHC (Hep39) et n'exprimant pas le VHC (Hepswx)	38 protéines dans Hep39 et 30 protéines dans Hepswx	ADRP (PLIN2) / TIP47 (PLIN3) / petites GTPases / CGI-49 / ubiquitin / HSP	Non
Cellules épithéliales	Ulmauf et al., 2004	Cellules de carcinome épithélial squameux humain (A431)	33 protéines	ADRP (PLIN2) / TIP47 (PLIN3) / Petites GTPases / CGI-58 / HSP / Stomatin	Non
	Orban et al., 2011	Globes oculaires bovins	45 protéines	PLIN1 / PLIN2 / PLIN3 / CGI-58 protéines chaperones / enzymes redox	Non
	Bouchoux et al., 2011	Entérocytes humaines Caco-2/TC7	105 protéines	PLIN2 / PLIN3 / ACSL3 / ACSL4 / ABDH5 (CGI-58) / HSD17B / petites GTPases / CNX	Non
	Moessinger et al., 2011	Cellules de carcinome épithélial squameux humain (A431)	> 700 protéines	TIP47 (PLIN3) / ACSL3 / ubiquitin / ATGL / CGI-49 / CGI-58 / Annexin / Rab7 / LPCAT1 / LPCAT2	siRNA LPCAT1 et LPCAT2
	Beilstein et al., 2013	Entérocytes humaines Caco-2/TC7	42 protéines	PLIN2 / PLIN3 / ACSL3 / DBH2 / ACSL5 / CNX / Petites GTPases	shRNA HSD17B2
Macrophage	Wan et al., 2007	Cellules humaines U937	67 protéines	ADRP (PLIN2) / TIP47 (PLIN3) / CGI-49 / CGI-58 / ACSL3 / HSP70 / Histones / Petites GTPases	Non
Myoblastes	Zhang et al., 2011	Lignée de cellules myoblastiques de souris immortalisées C2C12	324 protéines	PLIN2 / PLIN 3 / PLIN 4 / HSL / ACSL / CGI-58 / CGI-49 / ATGL	Non
Cellules β pancréatiques	Larsson et al., 2012	Cellules de Rat INS-1 832/13	96 protéines	Perilipin (PLIN1) / ADRP (PLIN2) / CGI-58 / CGI-49 / ATGL / ACSL / Petites GTPases / Histone H1.2 / Ubiquitin carrier protein	Non
Sébocytes	Dahlhoff et al., 2015	Lignée glandes sébacée humaines SZ95	54 protéines	PLIN2 / PLIN3 / ACSL3 / ACSL4 / ABDH5 (CGI-58) / Petites GTPases	siRNA ALDH1A3 et EPHX4
Cellules de Leydig	Wang et al., 2015	Souris de 10 semaines C57BL/6	337 protéines	PLIN1 / PLIN 2 / PLIN 3 / PLIN 4 / HSL / ATGL / CGI-58 / ACSL / petites GTPases / ubiquitin / CNX / HSP / COPI / COPII	Non
	Yamagushi et al., 2015	Lignée cellulaire tumorale de Leydig MLTC-1 de souris	80 protéines	PLIN1 / PLIN 2 / PLIN 3 / petites GTPases / HSL / métabolisme des stéroïdes / protéines chaperonnes	Non
Tissus	Références	Modèle d'étude	Nombre de protéines identifiées	Principales Protéines identifiées	Étude fonctionnelle
Foie	Wu et al., 2000	Souris CD1 au 12ème jour de lactation	4 protéines	ADPH (PLIN2) / FABP / Albumin / Transferrin	Non
	Turró et al., 2006	Rat mâle Sprague-Dawley	50 protéines	ADRP (PLIN2) / Petites GTPases / Caveolin-1 / Annexin	Non
	Crunk et al., 2013	Souris de 12 semaines C57BL/6	125 protéines en <i>low fat</i> (10%) et 134 protéines en <i>high fat</i> (60%)	PLIN2 / ACSL1 / CGI-58 / APOA1 / APOE / Annexin A5 / HSP	Non
	Kramer et al., 2018	Souris mâle de 4 mois C57BL/6	810 protéines pour les souris à jeun 24h et 784 protéines pour les souris à jeun 24h puis nourrit 6h	PLIN2 / PLIN5 (à jeun spécifique) / ACSL1 / ACSL5 (à jeun spécifique) / petites GTPases / CNX	KO Ces1d
Tissu adipeux	Kanshin et al., 2009	Souris mâle de 3 mois C57BL/6J	293 protéines	PLIN / APOA-1 / HSL	Non
	Yu et al., 2015	Souris mâle de 2 mois C57BL/6	169 protéines	PLIN1 / PLIN 4 / HSL / HSP / UbiE3 / petites GTPases / histones H2A et H4 / Caveolin-1	Non
Glande mammaire	Wu et al., 2000	Souris CD1 au 12ème jour de lactation	19 protéines	ADPH (PLIN 2) / HSP70 / TIF32 / ERP99	Non
Corps Jaune	Talbott et al., <i>unpublished</i> (D'après Talbott & Davis, 2017)	Tissu lutéal bovin	?	PLIN2 / PLIN 3 / HSL / HSD3B1 / CYP11A1 / StAR	?

Tableau 6 : Synthèse des analyses protéomiques de la gouttelette lipidique chez des modèles de mammifères.

3.1.1.1.3. Des acteurs protéiques de la gouttelette lipidique impliqués dans des physiopathologies humaines

Les PLIN ne sont pas les seules protéines exprimées à la surface des gouttelettes lipidiques comme nous avons pu le voir dans le **Tableau 6**. Certaines de ces protéines sont actuellement beaucoup étudiées car une mutation de leur gène peut être la source de pathologies sévères chez l'humain. Nous présentons ici quelques cas connus de maladies en lien avec le métabolisme des gouttelettes lipidiques. L'ensemble de ces données est résumé dans le **Tableau 7**.

Un acteur que l'on retrouve fréquemment dans les protéomes de la gouttelette d'huile est CGI-58-ABDH5 (Comparative Gene Identification 58 - α/β hydrolase domain-containing 5). Cette protéine (349 acides aminés – 45 kDa) est notamment beaucoup étudiée car la mutation de ce gène (possédant 7 exons), sur le chromosome 3p21, est responsable du syndrome de Dorfman-Chanarin (ou Ichthyose), une maladie autosomale récessive (Dorfman et al., 1974, Chanarin et al., 1975, Lefevre et al., 2001, Samuelov et al., 2011). En 2014, 33 mutations différentes de la protéine CGI-58 ont été rapportées (Missaglia et al., 2014). Cette maladie provoque l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les granulocytes (anomalie de Jordan – Jordan, 1953), les fibroblastes, les kératinocytes basaux, les myocytes et les hépatocytes conduisant généralement à une stéatose hépatique (Gupta & Kaur, 2005). Une soixantaine de cas a été rapportée dans le monde dans les zones du Moyen-Orient, du bassin Méditerranéen, en Inde ainsi qu'au Japon (Missaglia et al., 2014, Waheed et al., 2016). Chez les mammifères, la protéine CGI-58 est localisée sur les gouttelettes lipidiques cytosoliques en interaction avec la PLIN1 (cf. **Partie 3**).

Un acteur important dans les mécanismes de biogenèse de la gouttelette lipidiques est la protéine Seipin (cf. **Partie 3**). Une mutation du gène de la Seipin humaine (BCSL2) conduit à des formes sévères de lipodystrophie congénitale généralisée de Berardinelli-Seip (BSCL) (Magré et al., 2001). Trois autres mutations de gènes sont également impliquées dans l'apparition de cette maladie : AGPAT2 (BSCL1) (Agarwal et al., 2002), caveolin-1 (CAV1) (Kim et al., 2008) et cavin-1 (Hayashi et al., 2009, Rajab et al., 2010). Cette maladie autosomale récessive est caractérisée par une organomégalie, une insulino-résistance sévère aboutissant à un diabète de type 2, une hypertriglycéridémie, une stéatose hépatique et une absence de tissu adipeux dès la naissance. C'est une maladie très rare avec environ 250 cas rapportés dans la littérature (Quinn & Purcell, 2017).

La myopathie (dégénérescence et nécrose du tissu musculaire) est une maladie autosomale récessive liée à une mutation du gène *PNPLA2* (10 exons), localisé sur le chromosome 11p15.5, codant pour la protéine ATGL. ATGL est exprimé dans les tissus adipeux blanc et

brun. La délétion d'ATGL chez la souris réduit le mécanisme de lipolyse et favorise l'accumulation de lipides dans les tissus oxydatifs de l'organisme conduisant à la mort des souris en 3 mois (Zimmermann et al., 2004).

La maladie de Wolman est une maladie autosomale récessive touchant les jeunes enfants suite à une mutation du gène LIPA (Wolman et al., 1961). La mutation de LIPA conduit à un déficit de synthèse de la lipase acide lysosomale (LAL) (Onal et al., 2017). Cette maladie entraîne une accumulation d'esters de cholestérol et de TAG dans les lysosomes des leucocytes, les fibroblastes et les hépatocytes conduisant généralement à la mort de l'enfant par défaillance hépatique (Pericleous et al., 2017). C'est une maladie très rare avec uniquement 14 cas détectés jusqu'à présent dont la moitié provenant d'une union consanguine (Ikari et al., 2018).

Données Bibliographiques – Partie 2

Maladies	Anatomo-pathologies	Physiopathologie	Références
Ichthyose (maladie de Dorfman-Chanarin)	Accumulation de gouttelettes lipidiques dans les lymphocytes et des nombreux tissus	Mutation de CGI-58/ABDH5	Ghosh et al., 2008 ; Emre et al., 2010 ; Nur et al., 2015 ; Waheed et al., 2016
Myopathie		Mutation d'ATGL	Zimmermann et al., 2004
Obésité	Accumulation de lipides de réserves	Multifactorielles (génétique, environnementale, psychologique)	Faucher & Poitou, 2016
Stéatose hépatique	Accumulation de TAGs dans le cytoplasme des hépatocytes	Alcool ; Hépatites B et C	Madrigal-Matute and Cuervo, 2016
Maladie de Wolman	Déficit en lipase acide lysosomale provoquant une accumulation de TAGs et d'esters de cholestérol dans les leucocytes, les hépatocytes et les fibroblastes	Mutation de LIPA	Pericleous et al., 2017
Athérosclérose	Accumulation de plaques d'athérome (cholestérol) dans les artères	ACAT1 ; ABCA1 ; ADRP	Paul et al., 2008
Lipodystrophie généralisée congénitale de Berardinelli-Seip	Dystrophie du tissu adipeux	AGPAT2 ; Seipin ; Caveolin-1 ; Cavin-1	Garg and Agarwal, 2009 ; Vigouroux et al., 2011

Tableau 7 : Quelques exemples de maladies altérant le métabolisme des lipides chez les Mammifères.

3.1.1.2. Les *Arthropoda*

Les recherches sur la gouttelette lipidique des *Arthropoda* ont été principalement réalisées chez la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* qui constitue une espèce modèle en biologie du développement. Les recherches sur les gouttelettes lipidiques ont commencé par deux cribles de RNAi (Beller et al., 2008, Guo et al., 2008) montrant qu'approximativement 370 gènes, soit 1,5% du génome exprimé, participait à la physiologie des gouttelettes lipidiques.

Un double protéome de la gouttelette lipidique a été réalisée chez la drosophile. Une première étude a été effectuée au niveau du « fat body » abdominal, le tissu adipeux de la mouche et a permis l'identification de 248 protéines (Beller et al., 2006). Une deuxième étude a été réalisée sur des embryons entiers (Cermelli et al., 2006). Les protéomes de la gouttelette lipidique de *Drosophila melanogaster* présentent des similitudes avec ceux de mammifères. On retrouve, par exemple, deux membres de la famille des PLIN (*DmPLIN1* et *DmPLIN2*) dans le *fat body* abdominal, ainsi que la protéine CGI-58 dans le protéome d'embryons entiers. De ce fait, la drosophile constitue un modèle intéressant pour étudier le rôle des gouttelettes lipidiques dans le cadre de pathologies humaines (**Tableau 7**). Cependant, les PLIN3, PLIN4 et PLIN5 semblent restreintes aux vertébrés. *DmPLIN1* est uniquement présente à la surface des gouttelettes lipidiques et est impliquée dans les mécanismes de promotion/prévention de la lipolyse (Bi et al., 2012). Un profil d'hydrophobicité de *DmPLIN1* a été réalisé prédisant la présence de quatre hélices dans la région centrale de la protéine, pouvant lier des composés lipidiques (Arrese et al., 2008). L'interaction de ce domaine à quatre hélices avec la surface de la gouttelette lipidique a été confirmée par RMN (Lin et al., 2014). Des mouches mutantes déficientes pour la *DmPLIN1* présentent des gouttelettes lipidiques plus larges. Il a également été observé des gouttelettes lipidiques uniques et géantes au sein du fat body de ces mutants leur conférant un phénotype d'obésité (Grönke et al., 2007, Arrese et al., 2008, Beller et al., 2010). *DmPLIN2* est présente dans le cytoplasme et à la surface des gouttelettes lipidiques (Beller et al., 2010). *DmPLIN2* joue uniquement un rôle dans la prévention de la lipolyse (Bi et al., 2012). Des mutants *DmPLIN2* présentent des gouttelettes lipidiques plus petites en lien avec la perte de fonction de protection des gouttelettes lipidiques de la lipolyse (Grönke et al., 2007, Li et al., 2012). La mouche double mutante *dmPLIN1/DmPLIN2* présente un phénotype de réduction plus marqué de la taille des gouttelettes lipidiques. Cependant, les gouttelettes lipidiques sont toujours présentes chez ces mutants suggérant qu'il existe un mécanisme indépendant des *dmPLIN1* et *dmPLIN2* pour réguler le stockage et la lipolyse des gouttelettes lipidiques. *dHSL* (Hormone-Sensitive-Lipase) est une lipase participant à la lipolyse de la gouttelette lipidique et interagissant avec *DmPLIN1* (Bi et al., 2012).

Une analyse complémentaire de la protéine CG2254, identifiée dans le protéome de la gouttelette lipidique du fat body abdominal de *Drosophila* (Beller et al., 2006), a permis de la caractériser comme une Lipid Droplet subset deshydrogénase 1 (Lsdsh1) (Thul et al., 2017).

Un cas particulier et intéressant sur l'étude du protéome de la gouttelette lipidique de la drosophile est la présence d'histones dans le protéome de gouttelettes lipidiques de jeunes embryons entiers (Cermelli et al., 2006). Ces histones ne sont pas détectés dans le protéome du *fat body* abdominal (Beller et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés par une étude secondaire de la protéine Jabba qui coimmunoprécipite avec les histones (Li et al., 2012). Le même type de résultats (présence d'histones H2A, H2B et H4) a été obtenu pour le sphinx du tabac *Manduca sexta* (Soulages et al., 2012).

Il existe chez la drosophile un homologue de la protéine Seipin (protéine du réticulum endoplasmique impliquée dans la lipodystrophie congénitale) de mammifère (*DmSeipin*). Un knock-out de la *DmSeipin* entraîne une réduction de l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans le *fat body* et une relocalisation ectopique au niveau des glandes salivaires (Tian et al., 2011).

La drosophile est également le modèle qui a permis d'élucider le rôle de COP1 (Coat Protein I) comme régulateur de l'homéostasie des lipides, interagissant notamment avec les gouttelettes lipidiques (Beller et al., 2008). Les vésicules COP1 et COP2 participent au trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Lee et al., 2004). COP1 participe au transport vésiculaire de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique et inversement COP2 participe au transport des lipides et des protéines du réticulum endoplasmique vers le Golgi. Par des expériences de RNAi de la protéines ATGL (Adipose Triglycéride Lipase) et de traitements pharmacologiques avec des inhibiteurs de COP1 (Exo1 et Brefeldin A), les auteurs ont montré que COP1 régulaient la composition des PLIN à la surface des gouttelettes lipidiques et favorisait l'association avec ATGL pour réguler la lipolyse (Lippincott-Schwartz et al., 1991, Beller et al., 2008).

Les analyses des gouttelettes lipidiques ont été également réalisées chez d'autres espèces modèles comme le bombyx du mûrier *Bombyx mori* (Fónagy et al., 2005) ou le sphinx du tabac *Manduca sexta* (Soulages et al., 2012).

3.1.1.3. Les Nematoda

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un ver constituant un modèle d'étude notamment pour l'étude de l'apoptose, du développement embryonnaire et du vieillissement cellulaire. Ce nématode présente des gouttelettes lipidiques mesurant de 1 à 1,5 µm de diamètre (Shi

et al., 2013), dans son intestin et dans l'hypoderme. Trois études protéomiques de la gouttelette lipidique de *C. elegans* ont été réalisées (Zhang et al., 2012, Na et al., 2015, Vrablik et al., 2015). La première analyse protéomique *shotgun* a permis l'identification de 306 protéines dont 193 étaient connues comme pouvant s'associer avec les gouttelettes lipidiques de mammifère (Zhang et al., 2012). Cette première étude a notamment permis l'identification de la protéine DHS-3 à la surface de la gouttelette lipidique *via* une fusion GFP. Cette même équipe a analysé un second protéome de la gouttelette lipidique de *C. elegans*, identifiant 154 protéines dont 113 sont communes avec le premier protéome (Na et al., 2015). Ils ont identifié DHS-3 et MDT-28 comme les deux protéines majoritaires de la gouttelette lipidique de *C. elegans*. La délétion du gène *dhs-3* provoque une diminution de la taille des gouttelettes lipidiques ainsi que de leur quantité de TAG. Le mutant *mdt-28* provoque la formation de regroupements de gouttelettes lipidiques (Na et al., 2015). Un troisième protéome comparant la composition en protéine de la gouttelette lipidique d'un *C. elegans* contrôle et d'un mutant à haute teneur en graisse *daf-2(e1370)* révèle peu de différences à l'exception de MDT-28 qui est moins abondant chez le mutant (Vrablik et al., 2015). A l'aide d'une construction GFP, cette équipe a également localisé la protéine ACS-4, une acyl-CoA synthase, à la surface de la gouttelette lipidique de *C. elegans*. On a longtemps pensé que les périlipines avaient été perdues chez *C. elegans*. Cependant, trois isoformes homologues des périlipines de mammifères ont été identifiées : PLIN-1a, PLIN-1b et PLIN-1c. Ces isoformes présentent un domaine PAT N-terminal, une région amphiphile comprenant des hélices imparfaites ainsi que quatre hélices en C-terminal (Chughtai et al., 2015).

3.1.2. Les levures

Tout comme nous avons pu le décrire précédemment pour la drosophile, les levures sont des modèles d'études facilement cultivables au laboratoire. Ainsi, elles sont rapidement devenues des modèles d'études pour la compréhension de pathologies humaines impliquant les lipides de réserves.

3.1.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La levure du boulanger *Saccharomyces cerevisiae* constitue un modèle d'étude très répandu pour étudier la biologie des lipides car les voies de synthèses situées sur le RE sont similaires à celles des plantes et des animaux (Koch et al., 2014). Les gouttelettes lipidiques mesurent environ 400 nm chez cet organisme. Comme pour les cas précédents, le cœur hydrophobe des gouttelettes lipidiques de *S. cerevisiae* est composé de TAGs regroupés au centre et entouré de molécules de stéryl esters (Czabany et al., 2008). Les TAGs et les stéryls esters contribuent à 45-50% chacun du cœur hydrophobe (Leber et al., 1994). On retrouve également, en proportion mineure, du squalène (0,5%) et des stérols (< 0,3%). Le

cœur hydrophobe est entouré par une monocouche de phospholipides dont la composition est connue : 57% de PC, 21% de PI, 16% de PE, 2% de PA et 2% de PS (Tauchi-Sato et al., 2002, Grillitsch et al., 2011). La PC et le PI semblent donc jouer des rôles importants dans la structure et la fonction des gouttelettes lipidiques de *S. cerevisiae*. Le protéome de la gouttelette lipidique a permis de mettre en lumière des protéines contribuant à la synthèse du cœur hydrophobe, comme la stérol- Δ 24-méthyltransferase, la squalène époxidase et la lanosterol synthétase (Leber et al., 1994, Athenstaedt et al., 1999).

3.1.2.2. Autres modèles d'études

Pichia Pastoris est une levure méthylotrophique (le méthanol est ici la source de carbone) très couramment utilisée comme système d'expression de protéines hétérologues (Cregg et al., 2000, Daly & Hearn, 2005, Macauley-Patrick et al., 2005). Le cœur hydrophobe est constitué à 90% de TAGs et de stérols esters en moindre proportion possiblement du fait de la faible quantité de stérols présents chez *Pichia pastoris* (Ivashov et al., 2013). La monocouche de lipides polaires est principalement composée de PC et PE mais on retrouve également en proportion moins importante de la PI, de la PS, du PA, du cardiolipide, des lysophospholipides et de la DMPE (Ivashov et al., 2013). En comparaison avec le protéome de *S. cerevisiae*, 36 protéines ont seulement été identifiées par spectrométrie de masse chez *P. pastoris*. Leurs fonctions ont été identifiées par comparaison de séquences et recherches de motifs. Les protéines identifiées sont des orthologues de *S. cerevisiae* et on peut dégager de cette analyse des fonctions enzymatiques liées à la synthèse de l'ergostérol, des phospholipides, des sphingolipides mais également des protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras et de dégradation des lipides non polaires.

Yarrowia lipolytica (anciennement appelé *Candida lipolytica*) est une levure capable de se développer sur de nombreux milieux de culture contenant des composés hydrophobes, tels que des alcanes et des acides gras (Barth & Gaillardin, 1996). 21 protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse pour des cellules cultivées sur un milieu contenant du glucose contre 30 protéines pour des cellules cultivées sur un milieu contenant des oléates (Athenstaedt et al., 2006). En se basant sur les homologies de séquences de *S. cerevisiae*, les auteurs ont pu dégager cinq grandes fonctions des protéines de la gouttelette lipidique de *Y. lipolytica* : l'activation des acides gras (Faa1p), la synthèse des phospholipides (Sct1p, Pdr16p, Slc1p), le métabolisme des triacylglycérols (Tgl3p, Dga1p), le métabolisme des stérols (Tgl1p, Erg6p, Erg27p) et les mécanismes de transports (Djp1p, Csr1p, Pdr16p, Vps66p, Rab1p, Rab7p, Rab11p).

Mortierella alpina constitue le dernier modèle d'étude dont le protéome de la gouttelette lipidique a été étudié chez un champignon. Les gouttelettes lipidiques sont notamment

impliquées chez cet organisme dans le processus de vieillissement (Yu et al., 2017). De surcroît, *Mortierella alpina* est un champignon filamenteux intéressant car il produit de grandes quantités d'acide arachidonique (20:4^{Δ5,8,11,14}) associé au TAG (Ji et al., 2014). Le protéome de la gouttelette lipidique des mycéliums de *M. alpina* R807 présente 395 protéines dans les organismes contrôles et 411 protéines dans les organismes âgés. Contrairement à d'autres analyses, aucune protéine spécifique de la gouttelette lipidique n'a été détectée. Les auteurs ont identifié 10 protéines abondamment associées à la gouttelette lipidique notamment EF1α, l'actine, ATPβ, l'Histone H2B et l'Histone H4 précédemment décrites dans des protéomes de la drosophile ou de cellules de mammifère. La biosynthèse des lipides *de novo* et le métabolisme du glucose sont inhibés pendant le mécanisme de vieillissement. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, cette même équipe a complété cette première étude en réalisant une analyse comparative du protéome de la gouttelette lipidique en condition contrôle et en présence de deux sources d'azote : le nitrate de potassium (KNO₃) et l'urée (Yu et al., 2018). Les auteurs ont identifié 411 protéines en condition contrôle, 495 protéines en présence de KNO₃ et 501 en présence d'urée. Près de la moitié des protéines identifiées présente des fonctions inconnues.

Rhodospiridium toruloides est un basidiomycète rouge oléagineux isolé de la pulpe de bois des conifères. Le protéome de la gouttelette lipidique en conditions riche, carencée en azote ou en phosphate révèle 226 protéines associées dont 28 en lien avec le métabolisme des lipides (Zhu et al., 2015).

3.2. Les Amoebozoa

Les amibes sont des protozoaires caractérisés par la présence de plusieurs noyaux et d'une vacuole contractile. Une seule étude de la gouttelette lipidique a été recensée pour les Amoebozoa chez l'espèce modèle *Dyctyostelium discoideum*. *Dyctyostelium discoideum* est une amibe vivant sur des tapis de feuilles mortes dans les forêts, phagocytant des bactéries ou des levures (Malchow et al., 1967). L'analyse protéomique de la gouttelette lipidique de *D. discoideum* révèle 72 protéines dont une périlipine (pInA) (Du et al., 2013). Une première localisation de la périlipine de *Dyctyostelium* exprimé dans des cellules CHO avait permis de la localiser au niveau des gouttelettes lipidiques (Miura et al., 2002). Les auteurs ont également identifié 15 enzymes du métabolisme des lipides, 31 petites GTPases appartenant à la famille Rab, 11 protéines constituantes du réticulum endoplasmique et 6 protéines associées au cytosquelette. Les gouttelettes lipidiques de *D. discoideum* sont composées à 57,4% de TAG, 21,8% d'acide gras libre et 13,1% d'un lipide inconnu.

3.3. Les eucaryotes photosynthétiques issus d'une endosymbiose primaire

L'endosymbiose primaire mitochondriale puis chloroplastique constitue l'un des événements évolutifs les plus importants dans l'évolution des eucaryotes (Maréchal, 2018). L'acquisition du chloroplaste primaire s'est déroulée lorsqu'un organisme eucaryote inconnu a intégré une cyanobactérie Gram négative (Petroustos et al., 2014, Maréchal, 2018). Cet événement a conduit à l'émergence d'un organite photosynthétique disposant de deux membranes (membranes interne et externe de l'enveloppe). Se basant sur la machinerie des pigments photosynthétiques (Archibald & Keeling, 2002, Petroustos et al., 2014, Maréchal, 2018), trois lignées sont apparues (**Figure 25**) :

- 1) La lignée verte des endosymbiontes primaires : les *Viridiplantae*. Cette lignée inclut les *Chlorophyta* (« algues vertes ») et les *Streptophyta* (appelés couramment « plantes »). La machinerie photosynthétique est composée la chlorophylle a et b chez les *Viridiplantae*.
- 2) La lignée rouge des endosymbiontes primaires : les *Rhodophyta* ou « algues rouges ». Ces organismes possèdent des chlorophylles a et c, associées à la phycobiline.
- 3) La lignée bleue des endosymbiontes primaires : les Glaucocystophytes (*Cyanophora paradoxa*) possèdent un chloroplaste avec une paroi cellulaire résiduelle riche en peptidoglycanes. La chlorophylle a est associée à la phycocyanine et à l'allophycocyanine.

L'endosymbiose primaire a longtemps été considérée comme un événement unique au cours de l'évolution. L'étude de *Paulinella chromatophora* (une amibe photosynthétique) a mis en évidence qu'un second événement d'endosymbiose primaire plus récent aurait eu lieu (il y a 60 à 100 millions d'années) entre une cyanobactérie et une amibe (Marin et al., 2005, Nowack et al., 2008, Singer et al., 2007, Maréchal, 2018). Cette endosymbiose a conduit à la formation d'un organite aussi limité par deux membranes, appelé chromatophore.

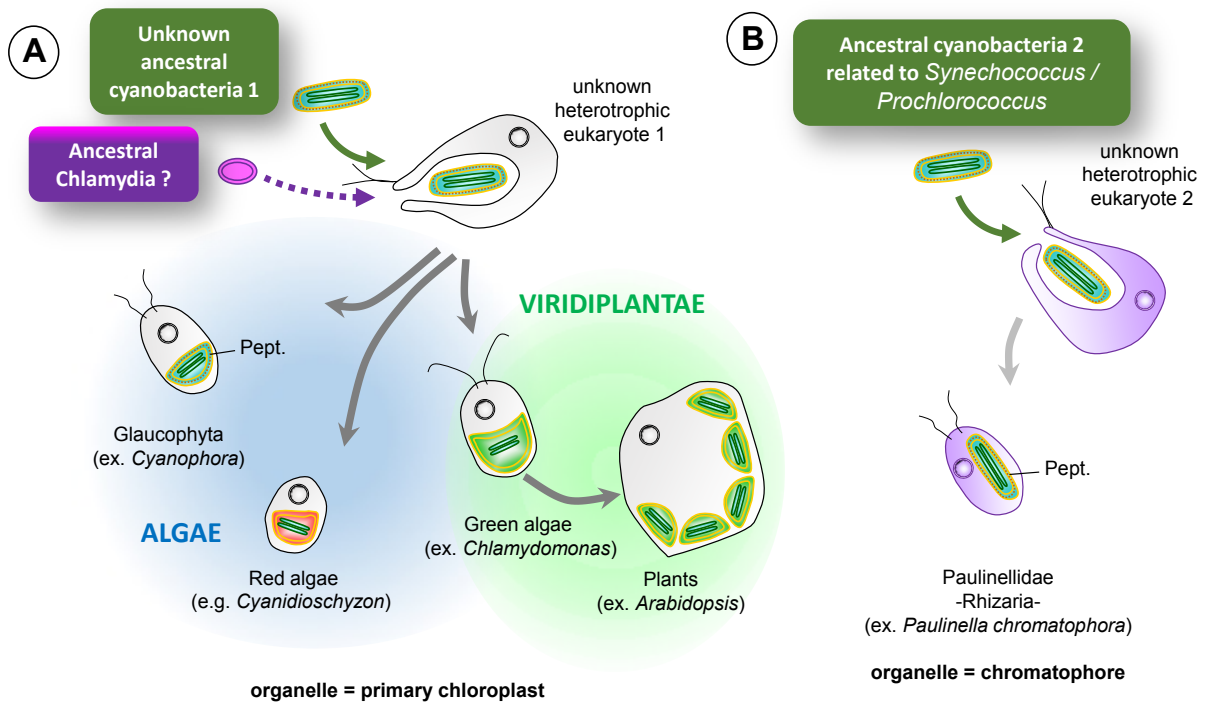


Figure 25 : Endosymbioses primaires. A : Endosymbiose primaire conduisant à l'apparition du chloroplaste primaire. Cet évènement a eu lieu il y a plus d'un milliard d'années. Cette endosymbiose conduit à l'apparition des Viridiplantae (algues vertes et plantes), la lignée rouge (Rhodophyta ou algues rouges) et la lignée bleue (Glaucophyta). Le chloroplaste des Glaucophyta renferme un peptidoglycane (Pept.). **B : Endosymbiose primaire indépendante conduisant à l'apparition du chromatophore chez les Paullinellidae.** Cet évènement a eu lieu il y a 100 à 60 millions d'années. Le chromatophore contient un peptidoglycane (Pept.) comme chez les cyanobactéries (D'après Maréchal, 2018).

3.3.1. Les *Viridiplantae*

Les plantes accumulent des gouttelettes lipidiques aussi bien dans les tissus végétatifs que dans les tissus reproducteurs (Chapman et al., 2012). L'implication des gouttelettes lipidiques dans la physiologie et le développement des plantes sont actuellement peu connus. Les gouttelettes lipidiques sont divisées en deux groupes distincts chez les plantes : les oleosin-based lipid droplets (OLDs) et les non-oleosin-based lipid droplets (NOLD) (Laibach et al., 2015).

3.3.1.1. Les protéines de gouttelettes lipidiques de plantes sont divisées en trois groupes fonctionnels

3.3.1.1.1. Les oléosines

Les oléosines ont été les premières protéines caractérisées à la surface des gouttelettes lipidiques des graines de *Zea mays* (Qu et al., 1986, Vance & Huang, 1987). De par leur petit poids moléculaire (15 à 26 KDa), les oléosines sont des protéines très abondantes à la surface des gouttelettes lipidiques de plantes. Structuellement, les oléosines sont divisées

en trois portions : 1) un peptide N-terminal court et amphiphile, 2) un peptide amphiphile C-terminal plus ou moins long et 3) une épingle hydrophobe de 72 acides aminés non polaires pénétrant la monocouche de phospholipides à la surface de la gouttelette lipidique (Huang & Huang, 2015, Huang, 2018) (**Figure 26**). Les peptides en N et C terminal forment un récepteur à la surface de la gouttelette lipidique permettant de lier des lipases et autres protéines associées entre autre pour la dégradation des TAGs (Huang & Huang, 2015). L'épingle de 72 acides aminés constitue quant à elle une spécificité des oléosines : ce sont des protéines de classe I (Kory et al., 2016). En particulier, ce type d'architecture protéique n'est pas retrouvé dans les protéines des gouttelettes lipidiques de mammifères (PLIN 1-6) ou de bactéries (Phasin). L'épingle se subdivise également en trois portions, constituées de deux bras de 30 acides aminés reliant une boucle de 12 acides aminés très conservés : $X_{30}PX_5SPX_3PX_{30}$. La boucle est constituée de trois prolines (P) et d'une sérine (S) formant une structure appelée le « Proline Knot » insérée dans le cœur hydrophobe (Abell et al., 1997). La structure secondaire de la boucle n'a pas été définie pour le moment. 17 gènes codent pour des oléosines chez *Arabidopsis thaliana* : 5 dans la graine, 3 de façon conjointe dans la graine et le grain de pollen et 9 dans les cellules florales du tapetum (tissu nourricier dans la paroi des anthères, permettant la maturation du grain de pollen) (Kim et al., 2002).

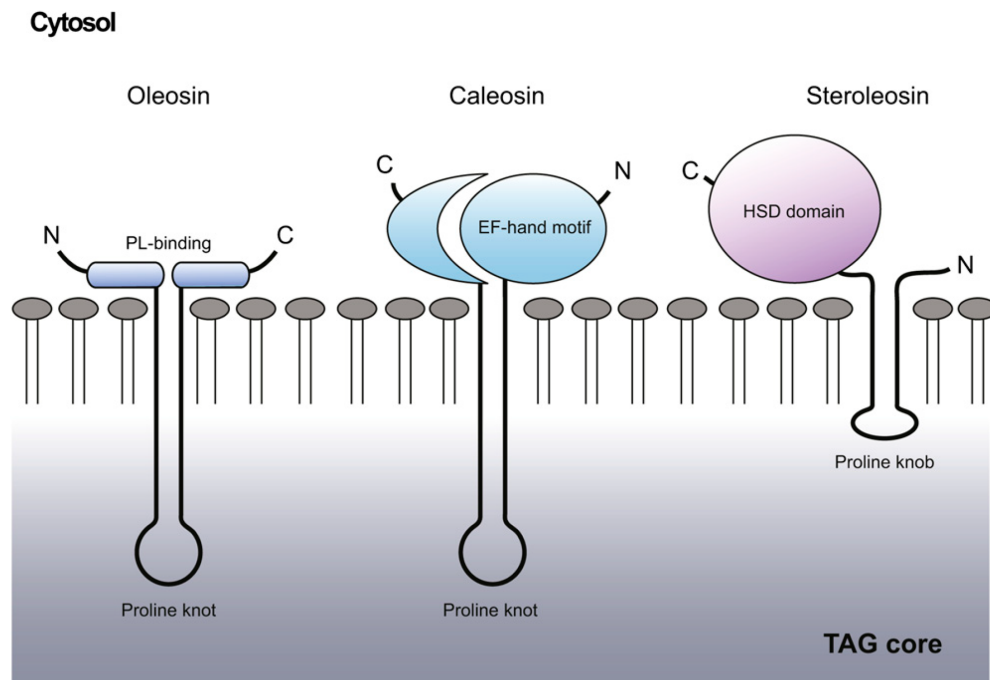


Figure 26 : Représentations schématiques des structures de l'oléosine, de la caléosine et de la stéroléosine à la surface d'une gouttelette lipidique. Les domaines N et C-terminaux font face au cytosol pour l'oléosine (domaine PL-binding), la caléosine (domaine de liaison au calcium de type main EF) et la stéroléosine (domaine HSD). Pour chaque protéine, on observe également le domaine hydrophobe majeur, chacun étant décrit comme pénétrant dans le cœur hydrophobe de la gouttelette lipidique. Ce domaine comprend ce que l'on appelle un "proline knot" ou un "proline knob". (D'après Chapman et al., 2012).

3.3.1.1.2. Les caléosines, les stéroléosines et les dioxygénases

Anthony H.C. Huang propose de regrouper ces trois protéines sous un seul groupe car elles présentent une fonction enzymatique commune dans la réponse aux stress (Huang, 2018).

Les caléosines sont des enzymes qui ont été découvertes dans les microsomes (Frandsen et al., 1996). Les caléosines, comme les oléosines, possèdent un segment hydrophobe plus court que celui de l'oléosine (21 acides aminés : $X_8PX_3PSPX_2PX_3$) ainsi qu'un motif « proline knot » (Chapman et al., 2012, Huang, 2018) (**Figure 26**). Ce sont des protéines de classe I (Kory et al., 2016). Une étude récente a montré que deux des prolines de la zone en épingle (P116 et P125) n'étaient pas essentielles pour la liaison à la gouttelette lipidique (Muller et al., 2017). Les caléosines possèdent un motif de liaison au calcium de type main EF en N-terminal (Chen et al., 1999), une activité peroxygénase (Hanano et al., 2006, Meesapyodsuk & Qiu, 2011) ainsi que plusieurs sites de phosphorylation. Le génome d'*Arabidopsis thaliana* code pour 8 caléosines (AtCLO1-8) exprimées dans des structures différentes : AtCLO1 et AtCLO2 sont exprimées dans la graine ; AtCLO3 et AtCLO4 sont exprimées dans plusieurs tissus, incluant les feuilles ; AtCLO5 est exprimée dans les fleurs ; AtCLO6 est exprimée ubiquitairement dans plusieurs organes ; AtCLO7 est exprimée dans les graines et fleurs et AtCLO8 n'est pas exprimée (Shen et al., 2014, Shimada & Hara-Nishimura, 2015).

Les stéroléosines (stérol déshydrogénases) possèdent uniquement deux domaines structuraux : une région N terminale hydrophobe et une région C-terminale présentant une séquence proche du domaine hydroxystéroïde déshydrogénase (HSD) des mammifères. Les stéroléosines possèdent également une épingle hydrophobe semi-conservée analogue à celle de l'oléosine, mais d'une taille similaire à celle de la caléosine (24 acides aminés : $X_3PPX_{10}PX_8$) (Chapman et al., 2012, Huang, 2018) (**Figure 26**). Ce sont donc également des protéines de classe I comme les oléosines et les caléosines (Kory et al., 2016). Contrairement aux oléosines et caléosines, les stéroléosines ne possèdent pas de motif « proline knot » mais un « proline knob » (Lin et al., 2002, Chapman et al., 2012). Les stéroléosines sont notamment étudiées car elles sont capables de convertir des stérols en brassinostéroïdes (Li et al., 2007, Baud et al., 2009), qui sont des phytohormones impliquées dans l'élongation cellulaire, la division et la régénération de la paroi cellulaire (Clouse & Sasse, 1998), l'élongation du pollen pour la formation du tube pollinique (Hewitt et al., 1985), la différenciation des faisceaux cribro-vasculaires (Caño-Delgado et al., 2004) et la réponse aux stress (Clouse & Sasse, 1998).

Des dioxygénases (α -DOX) ont également été découvertes récemment associées à des gouttelettes lipidiques dans des feuilles de cellules sénescents d'*Arabidopsis thaliana* (Shimada et al., 2014). *A. thaliana* possède deux homologues de ces dioxygénases (At α -

DOX1 et *A α* -DOX2) (Hamberg et al., 2005, Tirajoh et al., 2005). Les α -DOX ne présentent pas de longs segments hydrophobes comme les oléosines, caléosines et stéréoléosines. *A α* -DOX1 est localisée sur les gouttelettes lipidiques de feuilles et *A α* -DOX2 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Shimada et al., 2014). Ces enzymes sont notamment intéressantes car elles produisent à partir de l'acide α -linoléique (18:3^{A9,12,15}) des oxylipines (2-HOT) impliquant un intermédiaire non stable 2-HPOT, par ajout d'un groupe hydroperoxyde (-OOH). Ces molécules participent notamment aux mécanismes de défense en réponse à des stress biotiques et abiotiques (Shimada & Hara-Nishimura, 2015).

3.3.1.1.3. Les protéines associées à la gouttelette lipidique

Les « protéines associées à la gouttelette lipidique » ont été décrites et étudiées plus récemment (Gidda et al., 2013, Horn et al., 2013, Lopez-Ribeira et al., 2014, Gidda et al., 2016). Ce sont des petites protéines (25 à 27 kDa) ne présentant pas de motifs de liaisons ou de fonctions connues, ni de long segments hydrophobes. Ces protéines sont généralement localisées dans le cytosol, ne leur conférant pas un rôle structural évident dans la structuration et la fonction de la gouttelette lipidique.

3.3.1.2. Les gouttelettes lipidiques « *oleosin-based* » (OLD)

3.3.1.2.1. Phylogénie moléculaire des oléosines

Par une étude bioinformatique (Huang & Huang, 2015), Ming-Der Huang et Anthony H.C. Huang ont montré que les oléosines pouvaient être classées en 6 grandes lignées (**Figure 27**): la lignée primitive (P en bleu) évoluant des algues vertes jusqu'au *Filicophyta* (fougères), la lignée universelle (U oleosin en jaune) pour laquelle les gènes sont présents des *Bryophyta* (mousses) jusqu'aux plantes supérieures. La lignée universelle U a ensuite évolué pour se spécialiser vers des structures particulières telles que les oléosines spécifiques des graines avec les lignées SL (Low Molecular Weight Seed Oleosin en rose saumon) et SH (High Molecular Weight Seed Oleosin en violet) chez les Angiospermes (Huang & Huang, 2015). Les oléosines se sont également spécialisées chez les *Brassicaceae* avec la lignée T du tapetum (en vert) et la lignée M (non indiqué sur la **Figure 27**) pour les oléosines du mésocarpe des Lauraceae (avocat).

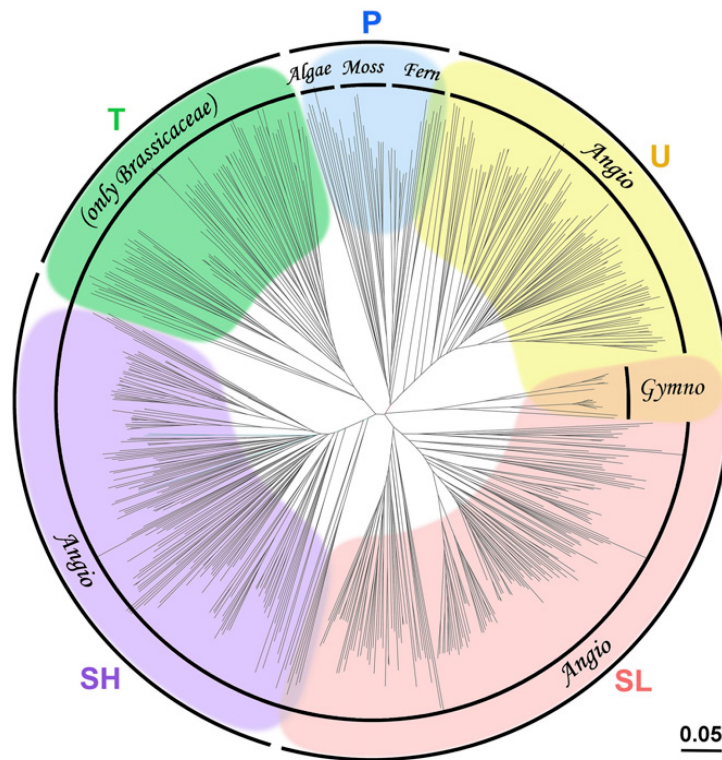


Figure 27 : Phylogénie non enracinée d'environ 600 oléosines provenant d'algues vertes, de plantes primitives et de Spermatophytes. (d'après Huang & Huang, 2015).

3.3.1.2.2. Diversité et complexité des OLD

Chez les plantes supérieures, les OLD sont réparties dans l'ensemble des organes de la plante : graines, pollens, fleurs, fruits et autres organes végétatifs. Les graines constituent la structure la plus étudiée pour la compréhension des gouttelettes lipidiques chez les plantes supérieures car elles sont capables d'accumuler des triacylglycerols sous forme de gouttelettes lipidiques de réserve permettant de soutenir la germination après la fin de la phase de dormance (Huang, 1996). Il existe des cas particuliers comme la graine de jojoba (*Simmondsia chinensis*) qui contient des cérides (Yermanos, 1975). Ces gouttelettes lipidiques sont de petites tailles (entre 0,5 et 1,5 μm) conférant une large surface par unité de TAGs facilitant la fixation des lipases durant la germination (Huang & Huang, 2015). Les gouttelettes lipidiques sont réparties dans l'ensemble des structures de la graine. De nombreuses études protéomiques ont été réalisées chez le colza *Brassica napus* (Katavic et al., 2006, Jolivet et al., 2009), *Arabidopsis thaliana* (Jolivet et al., 2004, Vermachova et al., 2011), le sésame *Sesamum indicum* (Lin et al., 2005), le pourghère *Jatropha curcas* (Popluechai et al., 2011, Liu et al., 2015), le tarweed du Chili *Madia sativa* (Acevedo et al., 2012), le noisetier du Chili *Gevuina avellana* (Acevedo et al., 2012), le maïs *Zea mays* (Tnani et al., 2011), la cameline *Camelina sativa* (Jolivet et al., 2013) ou l'arachide *Arachis hypogaea* (Jolivet et al., 2013). Ces analyses protéomiques montrent que les gouttelettes lipidiques sont recouvertes d'oléosines (types SL et SH) avec une présence plus minoritaire

(moins de 5%) de caléosine et de stéroléosine (Chapman et al., 2012, Murphy, 2012). Les oléosines sont impliqués dans la régulation de la taille et de la stabilité des gouttelettes lipidiques des graines (Chapman et al., 2012). De surcroît, il est également possible que deux oléosines isoformes SL et SH forment des dimères ou des multi-dimères augmentant la stabilité de la gouttelette lipidique face aux stress abiotiques (Huang, 2018).

Les anthères constituent la partie terminale de l'étamine au niveau de l'appareil reproducteur mâle (androcée) de la fleur. Les anthères sont composées de deux thèques renfermant chacun deux sacs polliniques. Le tapetum constitue une couche unicellulaire au sein de la cavité de l'anthère. Dans le cas des *Brassicaceae*, on retrouve deux types de gouttelettes lipidiques :

- Les gouttelettes lipidiques au niveau des oléoplastes (plastoglobules).
- Les tapétosomes (gouttelettes lipidiques cytosoliques) jouant un rôle important pendant la maturation des grains de pollens chez les *Brassicaceae* (Hsieh & Huang, 2004). Chaque tapétosome renferme des regroupements de gouttelettes lipidiques de petites tailles (0,1 à 0,5 μm). Le cœur hydrophobe de ces gouttelettes lipidiques est constitué de TAGs, mais également d'alcane et de flavonoïdes entourés d'une monocouche de phospholipides dans laquelle s'insèrent des T-oléosines.

Les grains de pollen sont enfermés dans les sacs polliniques de l'anthère puis disséminés par le vent ou par des insectes durant la pollinisation. Les grains de pollens sont riches en métabolites de réserve (grains d'amidon, gouttelettes lipidiques). Les gouttelettes lipidiques de pollen présentent à leurs surfaces des oléosines (type U), des caléosines et des stéroléosines. La germination commence lorsque le grain de pollen atterrit sur le pistil (appareil reproducteur femelle ou gynécée) d'une fleur femelle de la même espèce. Le grain de pollen germe ensuite sur le stigmate de la fleur femelle aboutissant à la formation du tube pollinique. Une récente étude protéomique a été réalisée sur des gouttelettes lipidiques purifiées du tube pollinique de *Nicotiana tabacum* (Kretschmar et al., 2018). Les auteurs ont identifiés 24 protéines incluant deux caléosines (NtCLO1a, NtCLO1b), deux oléosines (NtOLE6a, NtOLE6b), trois Lipid droplet-associated proteins (NtLDAP1a, NtLDAP1b, NtLDAP3a). L'étude s'est orientée sur PUX10 (Plant UBX Domain-containing Protein 10) dont la localisation a été confirmée par fusion avec la *enhanced GFP* (eGFP) à la surface des gouttelettes lipidiques pendant le développement embryonnaire, la germination des graines et le tube pollinique. PUX10 recrute par son domaine UBX une AAA-type ATPase Cell Division Cycle 48 (CDC48) qui facilite le transfert de la protéine polyubiquitinée vers le protéasome 26S (**Figure 28** et **Partie 3**). Le même type de mécanisme a été décrit au même moment, par une deuxième équipe, pour la germination de plants d'*Arabidopsis thaliana* (Deruyffelaere et al., 2018).

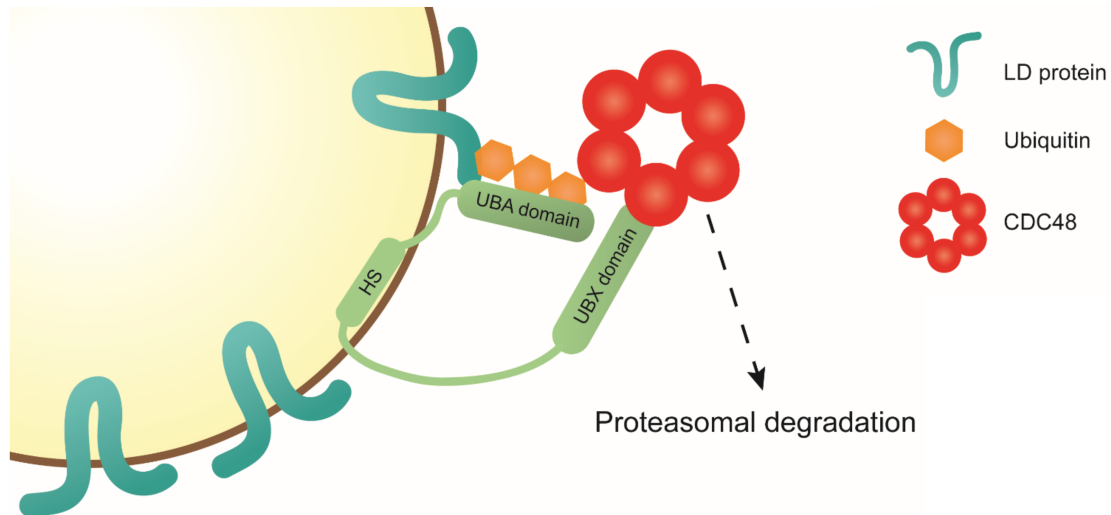


Figure 28 : Rôle de PUX10 à la surface des gouttelettes lipidiques du tube pollinique de *Nicotiana tabacum*. Les protéines de la gouttelette lipidique destinées à la dégradation sont polyubiquitinées par des motifs ubiquitines K48 (hexagone orange) (Cf. **Partie 3**). PUX10 présente trois domaines : un domaine UBA reconnaissant les motifs ubiquitines K48, un motif Hydrophobic Stretch (HS) associé à la gouttelette lipidique et un motif UBX recrutant CDC48 (anneau rouge). CDC48 facilite le transfert de la protéine polyubiquitinée vers le protéasome 26S (D'après Kretschmar et al., 2018).

Les gouttelettes lipidiques sont également présentes dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Le nombre de gouttelettes lipidiques est très faible dans les feuilles saines. Les gouttelettes lipidiques s'accumulent davantage dans les feuilles en phase de sénescence (Shimada et al., 2015) avec une taille variable de 1 à 18 μm (Lersten et al., 2006). Les auteurs ont notamment montré que l'expression de la caleosin-3 d'*Arabidopsis thaliana* (*AtCLO3*) ainsi que de l' α -dioxgénase (*At α -DOX1*) augmentait pendant la sénescence (Shimada et al., 2014). Une analyse protéomique de la gouttelette lipidique de feuilles vieillissantes d'*A. thaliana* a été réalisée : les auteurs ont identifié 28 protéines dont 9 enzymes impliquées dans le métabolisme secondaire de défense de la plante (Brocard et al., 2017). L'analyse révèle également la présence d'*AtCLO3*, d'*At α -DOX1* et de la Small Rubber Particle 1 (*AtSRP1*). L'analyse fonctionnelle d'*AtSRP1* révèle que cette protéine module l'expression d'*AtCLO3* dans les feuilles vieillissantes. De surcroît, la surexpression d'*AtSRPA* induit une augmentation de l'accumulation de TAG enrichi en 18:3 provenant d'un recyclage des galactolipides (MGDG et DGDG) des thylakoïdes (Brocard et al., 2017).

Les gouttelettes lipidiques du mésocarpe des fruits peuvent atteindre des tailles de 10 à 20 μm les plaçant en tête du classement des plus grandes gouttelettes lipidiques observables chez les cellules eucaryotes (Horn et al., 2013). Une analyse protéomique du mésocarpe de l'avocat (*Persea americana*) a permis l'identification de deux protéines associées LDAP1 et LDAP2 (Lipid Droplet-Associated Proteins 1 et 2) présentant également des homologies de

séquences avec la SRPP (cf. **point 3.3.1.3.1.**) des particules de caoutchouc (Horn et al., 2013). Des oléosines de type M, spécifiques de la famille des *Lauraceae*, ont été décrites chez l'avocat (Huang, 2018). Cependant, ces oléosines semblent famille-dépendante car aucune oléosine n'a été décrite dans le mésocarpe du palmier à huile *Elaeis guineensis* (Bourgis et al., 2011) ou de l'arbre à suif chinois *Triadica sebifera* (Zhi et al., 2017).

Enfin, des petites gouttelettes lipidiques (0,5 µm de diamètre) ont également été décrites dans les cellules épidermiques des feuilles, des fleurs et des ovaires, au sein de l'ordre des Asparagales [plantes monocotylédones présentant une importance économique pour l'alimentation (*Allium cepa*) et les arômes (*Vanilla planifolia*, *Aloe vera*)] (Huang, 2018). Les gouttelettes peuvent se regrouper par dizaine formant des amas d'une dizaine de micromètre (Kwiatkowska et al., 2010, Kwiatkowska et al., 2015).

3.3.1.3. Les gouttelettes lipidiques « *non-oleosin-based* » (NOLD)

3.3.1.3.1. Les particules de caoutchouc

Plus de 20000 espèces de plantes supérieures peuvent accumuler des particules de caoutchouc au sein de leurs organes végétatifs (Hagel et al., 2008). *Hevea brasiliensis* constitue la source principale de latex exploitée par l'homme. Le latex est une suspension blanche colloïdale composée de particules caoutchouteuses et non-caoutchouteuses, d'organites, de protéines, de lipides, de glucides et de minéraux. Ces particules possèdent un cœur hydrophobe constitué de *cis*-1,4-polyisoprène entouré d'une monocouche de phospholipides dans laquelle s'enchaînent des protéines (Berthelot et al., 2014). Le protéome des particules de caoutchouc a permis de mettre en évidence deux protéines majoritaires : la Small Rubber Particle Protein (SRPP) et le Rubber Elongation Factor (REF) (Oh et al., 1999, Sando et al., 2009). Trois homologues de la SRPP ont été détectés chez *A. thaliana* : SRP1, SRP2, SRP3 (Kim et al., 2016). SRP1 a notamment été détecté au niveau des gouttelettes lipidiques de feuilles d'*A. thaliana* vieillissantes (Brocard et al., 2017).

3.3.1.3.2. Les plastoglobules

Les plastoglobules sont des gouttelettes lipidiques particulières synthétisées dans le chloroplaste (Bréhélin et al., 2007). Les plastoglobules sont en continuité avec la monocouche externe des thylakoïdes chez les plantes supérieures, ce qui est supposé faciliter les échanges de métabolites (van Wijk & Kessler, 2017). Les plastoglobules se présentent comme un cœur hydrophobe de trois classes de molécules :

- 1) Lipides neutres (TAGs, phytol esters et acides gras libres).
- 2) Tocophérols et quinones (α -tocopherol, Plastoquinol-9, Plastochromanol-8, Vitamine K₁).

- 3) Caroténoïdes linéaires (lycopène), caroténoïdes cycliques (lutéine et les xanthophylles) et esters de caroténoïdes.

Ces molécules sont entourées d'une monocouche de lipides amphiphiles (MGDG, DGDG, SQDG) dans laquelle s'enchâssent des protéines. Les analyses protéomiques de plusieurs modèles d'études (le chromoplaste du poivron rouge *Capsicum annuum* et les microalgues vertes *Dunaliella bardawil* et *Chlamydomonas reinhardtii*) ont permis l'identification d'une trentaine de protéines (Davidi et al., 2015, Kreimer, 2009). La protéine majoritairement représentée à la surface des plastoglobules est la Plastid-lipid Associated Protein, Fibrillin (PAP/Fibrillin) (Laizet et al., 2004, Youssef et al., 2010). Cette protéine de 30 kDa ne présente pas de segments transmembranaires.

3.3.2. Les *Chlorophyta* (algues vertes)

Chlamydomonas reinhardtii accumule des huiles sous forme de gouttelettes lipidiques après une carence en azote ou une augmentation de salinité (Goodson et al., 2011, Siaut et al., 2011). Une étude protéomique de la gouttelette lipidique a été réalisée chez *C. reinhardtii* mettant en évidence la Major Lipid Droplet Protein (MLDP) de 27 kDa (Moellering & Benning, 2010, Nguyen et al., 2011, James et al., 2011). La mise en place d'un mutant *mldp* suggère que la MLDP est impliquée dans la régulation de la taille des gouttelettes lipidiques (Moellering & Benning, 2010). Un homologue de 33 kDa de la MLDP a été également retrouvé chez *Haematococcus pluvialis* sous le nom *Haematococcus Oil Globule Protein* (HOGP) (Peled et al., 2011) ainsi que chez trois espèces de *Dunaliella* (Davidi et al., 2012). La MLDP a été également détectée chez *Scenedesmus quadricauda* CASA-CC202 lors de stress salins ou d'une carence en azote (Javee et al., 2016). Des orthologues de la MLDP sont également présents chez plusieurs espèces de *Chlorophyta*: *Volvox carteri*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Coccomyxa* sp C-169, *Chlorella variabilis*, *Polytomella parva*, *Prototheca wickerhamii* et *Micromonas pusilla* CCMP1545 (Goold et al., 2015). Aucun homologue de la MLDP n'a été identifié chez les diatomées.

Une équipe de recherche Taiwanaise a identifié une caléosine de 28 kDa comme protéine majoritaire de la gouttelette lipidique de *Chlorella* sp. (Lin et al., 2012). La taille des gouttelettes lipidiques de *Chlorella* sp. peut atteindre 3 µm (Lin et al., 2012). La localisation de la caléosine a été spécifiquement déterminée à la surface de la gouttelette lipidique par immunomarquage à l'aide de billes d'or (Pasaribu et al., 2014a).

Une dernière étude protéomique a été réalisée sur le modèle d'étude *Lobosphaera incisa* SAG 2468, une microalgue oléagineuse isolée sur un glacier japonais (Siegler et al., 2017). Cette microalgue présente la particularité d'accumuler de l'acide arachidonique au sein de

ses molécules de TAG (Bigogno et al., 2002). Les auteurs ont identifié 279 protéines dans les trois réplicats biologiques et ont confirmé la localisation de trois protéines à la surface de la gouttelette lipidique par expression hétérologue dans des tubes polliniques de tabac : *LiMLDP*, *LiLBP62* et *LiLBP36* (lipase putative).

3.4. Les endosymbiontes secondaires

Les endosymbioses secondaires sont des événements qui se sont produits à plusieurs reprises au cours de l'évolution des eucaryotes (Petrousos et al., 2014) (Figure 29). Deux grands types de lignées sont apparus suite à ces événements évolutifs :

- Les lignées vertes provenant de l'intégration d'une algue verte à l'intérieur d'un organisme eucaryote hétérotrophe inconnu conduisant à l'apparition des *Euglenozoa* et des Chlorarachniophytes.
- Les lignées rouges provenant de l'intégration d'une algue rouge à l'intérieur d'un organisme eucaryote formant le groupe polyphylétique des *Chromalveolata*.

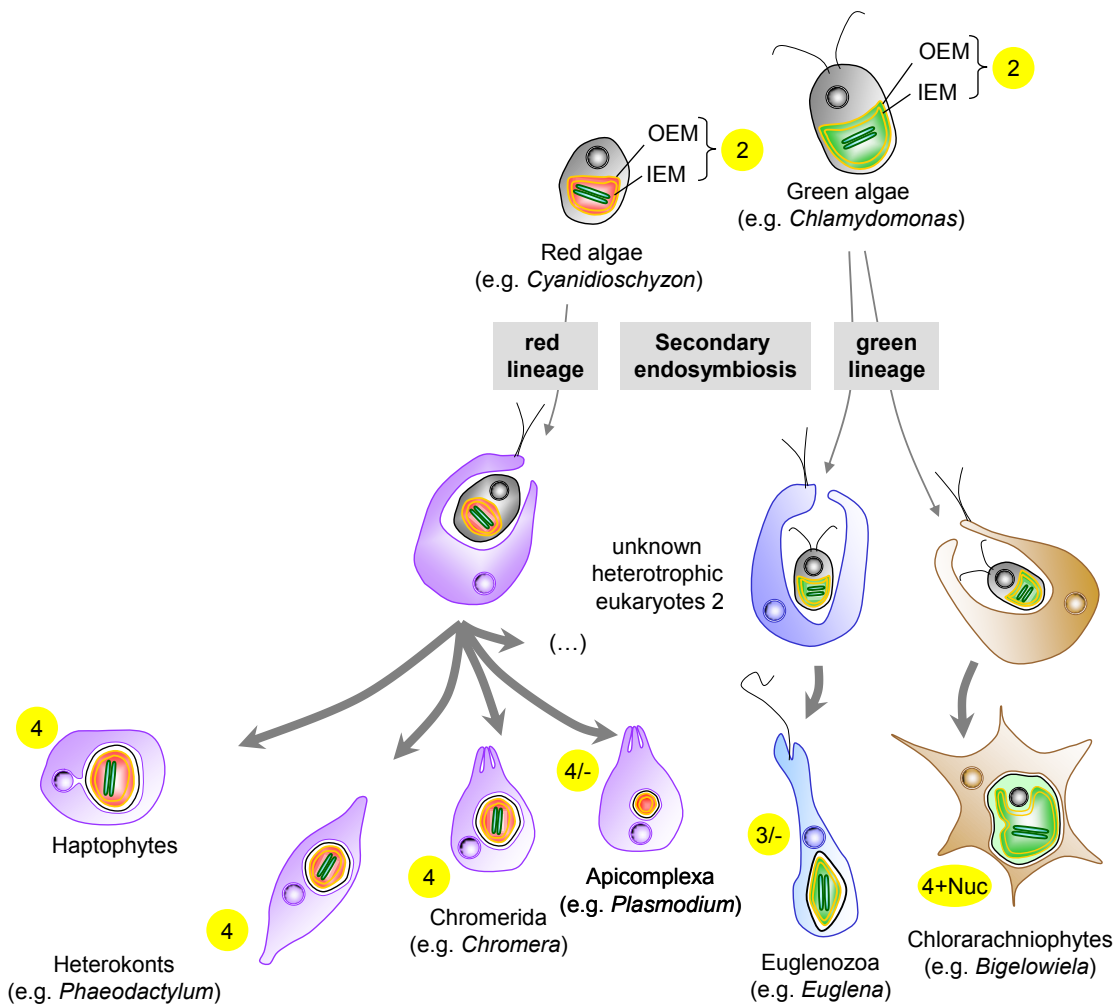


Figure 29 : Plusieurs événements d'endosymbioses secondaires. (Modifié d'après Petrousos et al., 2014). Une description détaillée de cette figure est présentée dans la Figure 8B (Cf. Partie 1).

3.4.1. Les organismes issus de la lignée verte : les *Euglenozoa*

Au moins deux événements indépendants d'endosymbiose secondaire entre une algue verte et un organisme eucaryote hétérotrophe inconnu a conduit à l'apparition des *Euglenozoa* et des Chlororarachniophytes (**Figure 29**) (Petroutsos et al., 2014, Cavalier-Smith, 2018, Fussy & Obornik, 2018). Les Chlororarachniophytes (*Bigelowiella natans*) sont des organismes possédant un chloroplaste à quatre membranes ainsi qu'un noyau résiduel, appelé le nucléomorphe se localisant entre les deux membranes les plus internes et les plus externes du chloroplaste (Curtis et al., 2012, Petroutsos et al., 2014). De par le manque de données publiées sur le métabolisme des lipides chez ces organismes, nous évoquerons uniquement les *Euglenozoa* dans ce paragraphe.

Les *Euglenozoa* sont constitués d'espèces possédant un chloroplaste particulier à trois membranes mais également d'espèces parasites dépourvues de chloroplastes pouvant infecter l'homme (Petroutsos et al., 2014). Plusieurs études rapportent que ces organismes parasites comme *Trypanosoma cruzi*, l'agent de la maladie de Chagas (D'Avila et al., 2011), *Leishmania amazonensis* (Lecoeur et al., 2013) et *Leishmania major*, agents de la leishmaniose (Rabhi et al., 2012, Rabhi et al., 2016) sont capables d'induire la formation de larges gouttelettes lipidiques chez les macrophages.

Chez les organismes photosynthétiques, *Euglena gracilis* est une microalgue vivant dans les eaux douces, intéressantes pour les recherches d'alternatives aux ressources pétrolières car elle accumule des cérides (appelés aussi esters d'alcool gras ou wax esters) au sein de gouttelettes lipidiques en carence d'azote. Ces cérides proviennent de la conversion d'un β -1,3-glucane sous forme cristalline, le paramylon. Les wax esters peuvent être utilisés comme carburant pour l'aviation mais également comme biocarburant après raffinage (Guo et al., 2017). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude approfondie de la structure de la gouttelette lipidique d'*E. gracilis*.

3.4.2. Les organismes issus de la lignée rouge : les *Chromalveolata*

3.4.2.1. Les *Chromerida*

Les *Chromerida* comprennent des espèces photosynthétiques, présentant une paroi épaisse, un chloroplaste contenant uniquement de la chlorophylle a et un flagelle en développement interne à certains stades du cycle de vie. La littérature sur les lipides des *Chromerida* est actuellement très pauvre (6 articles en 2018). Les glycérolipidomes des deux modèles *Chromera velia* et *Vitrella brassicaformis* ont été étudiés (Tomčala et al., 2017). La composition lipidique des thylakoïdes a été analysée en 2011 (Botté et al., 2011).

Cependant, aucune étude n'a été réalisée jusqu'à présent sur les gouttelettes lipidiques des *Chromerida*.

3.4.2.2. Les *Apicomplexa*

Les *Apicomplexa* constituent un phylum regroupant des organismes unicellulaires parasites responsables de nombreuses maladies chez les Métazoaires telles que le paludisme ou la toxoplasmose. Comme nous avons pu le voir précédemment avec les bactéries pathogènes, les *Euglenozoa* parasites ou le VHC, ces organismes sont également capables de détourner le métabolisme lipidique de l'hôte en induisant la formation de gouttelettes lipidiques ou en modifiant leur architecture.

L'un des modèles d'Apicomplexa le plus couramment étudié est *Toxoplasma gondii*, l'agent de la toxoplasmose. *T. gondii* se réplique dans les cellules de mammifères au sein d'une vacuole parasitophore (VP). Cette VP ne fusionne pas avec les membranes de l'hôte et forme donc une barrière pour les nutriments. La réplication de *T.gondii* est réduite dans les hôtes présentant moins de gouttelettes lipidiques ou dont la lipolyse est altérée (Nolan et al., 2017). *Toxoplasma* induit l'augmentation de l'activité catalytique de la DGAT de l'hôte, provoquant une orientation du métabolisme lipidique vers les TAG et garantissant un import d'acides gras (Hu et al., 2017).

3.4.2.3. Les *Dinophyta*

Les Dinophyta ou Dinoflagellés sont des protistes photosynthétiques, mais également mixotrophes et hétérotrophes, présentant deux flagelles leur permettant de se déplacer. Il existe des formes symbiotiques de Dinoflagellés, en particulier avec des coraux. En comparaison des diatomées, les dinoflagellés présentent une thèque composée de plaques de cellulose pouvant présenter des ornements (Sardet, 2013). Les gouttelettes lipidiques sont présentes dans les hôtes et les symbiotes des endosymbioses coraux-dinoflagellés (Kellogg & Patton, 1983). Une première analyse du protéome des gouttelettes lipidiques gastrodermales d'*Euphyllia glabrescens* a révélé la présence de 42 protéines impliquées dans le métabolisme des lipides et des protéines ainsi que dans la réponse à certains stress (Peng et al., 2011). Par microscopie électronique à transmission, les auteurs ont montré notamment la présence de zones denses aux électrons suggérant la présence de TAG riches en acides gras insaturés. Une seconde analyse protéomique des gouttelettes lipidiques de *Symbiodinium sp.*, provenant également des tentacules de coraux d'*Euphyllia glabrescens* a permis de mettre en évidence une *Symbiodinium* Lipid Droplet Protein (SLDP) de 20 kDa jouant un rôle dans la stabilité structurale et fonctionnelle de la gouttelette lipidique (Pasaribu et al., 2014b). De surcroît, l'utilisation d'un anticorps anti-caléosine provenant du sésame (*Sesamum indicum*) ou du cycas du Japon (*Cycas revoluta*) permet de détecter la SLDP suggérant un rôle similaire de cette protéine à la caléosine des plantes

supérieures. Une analyse protéomique de la gouttelette lipidique du symbionte seul, *Symbiodinium spp.*, a également été réalisée (Jiang et al., 2014). Cette étude ne révèle pas la présence de la SLDP, mais de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (Sterol transfer family protein), la signalisation cellulaire (14-3-3 protein, ADP ribolysation factor), la réponse aux stress (HSP90) et le métabolisme énergétique (ATP synthase F1 sous unité α , GTP binding protein).

3.4.2.4. Les *Haptophyta*

Les *Haptophyta* incluent des espèces photosynthétiques formant des coques extracellulaires de carbonate de calcium (coccosphères des coccolithophores) et non calcifiées (Cavalier-Smith, 1986). Les haptophytes présentent deux flagelles et un haptonème qui est un appendice filiforme caractéristique de ce phylum (Sardet, 2013). Une étude protéomique a été réalisée chez l'haptophyte non calcaire *Tisochrysis lutea*, anciennement *Isochrysis galbana* (Shi et al., 2015). Cette microalgue est intéressante pour l'industrie aquacole car c'est une espèce enrichie en acide docosahexaénoïque (DHA) (Hubert et al., 2017). Cette microalgue est aussi connue pour accumuler un lipide neutre particulier à la place des TAGs: un alkénone, un cétone à très longue chaîne (C_{37} à C_{40}), au sein d'un *alkenone body* (AB) (Marlowe et al., 1984a, Marlowe et al., 1984b). La purification de la gouttelette lipidique a permis de déterminer la présence de 74,2% d'alkénone (C_{37} et C_{38}), 24,6% d'autres lipides et 1,2% d'alcène. L'analyse protéomique révèle la présence de 514 protéines à la surface de l'AB de *T. lutea* dont 3 majoritaires : une V-ATPase identifiée précédemment dans une analyse protéomique en carence d'azote (Song et al., 2013), une protéine contenant un domaine SPFH (Stomatin / Prohibitin / Flotillin / HflK), localisé dans le réticulum endoplasmique, associée à un radeau lipidique et une protéine hypothétique (EMIHUDRAFT_465517) (Shi et al., 2015).

Une dernière étude décrit le protéome de la gouttelette lipidique d'*Isochrysis zhangjiangensis*, identifiant 133 protéines annotées fonctionnellement (Shen et al., 2016). Les auteurs ont identifié une protéine majeure de la gouttelette lipidique (Coccolith scale associated protein-1, Unigene 10956) ainsi que des protéines du cytosquelette (Unigene 11735), du métabolisme lipidique, de trafic membranaire et de réponse aux stress.

3.4.2.5. Les *Heterokonta*

Comme nous l'avons présenté dans la **Partie 1**, les *Heterokonta* constituent un superphylum dans le règne des *Chromista* (Cavalier-Smith, 2018). Quatre études protéomiques ont été réalisées chez quatre espèces modèles d'Heterokonta : *Nannochloropsis oceanica* (Vieler et al., 2012), *Phaeodactylum tricornutum* (Yoneda et al., 2016), *Fistulifera solaris* (Nojima et al., 2013) et *Aurantiochytrium limacinum* (Watanabe et al., 2017).

Une première étude protéomique, très sommaire, a été publiée chez l'organisme modèle *Phaeodactylum tricornutum* (Yoneda et al., 2016) pendant la première année de mon travail de thèse. Cette publication a conduit à la caractérisation fonctionnelle de la Straménopile Lipid Droplet Protein (StLDP – Phatr48859). Cette protéine de 456 acides aminés (49 kDa) présente un domaine hydrophobe de 54 acides aminés (en position 222-275) formant un motif $X_7PX_9PX_{10}PX_3PX_{23}$ (où P représente une proline) ainsi que deux domaines en N et C terminal conservés chez d'autres microalgues (*Fragilariopsis cylindrus*, *Pseudo-nitzschia multiseries*, *Thalassiosira pseudonana*, *Thalassiosira oceanica* et *Nannochloropsis gaditana*) et macroalgue (*Ectocarpus siliculosus*). Deux hélices α transmembranaires ont été prédites dans la région centrale hydrophobe. Ce domaine hydrophobe de la StLDP semble indiquer un rôle stabilisateur/mobilisateur de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum*. La localisation de la StLDP a été confirmée à la surface de la gouttelette lipidique par fusion avec une protéine fluorescente eGFP (Yoneda et al., 2018) (**Figure 30**).

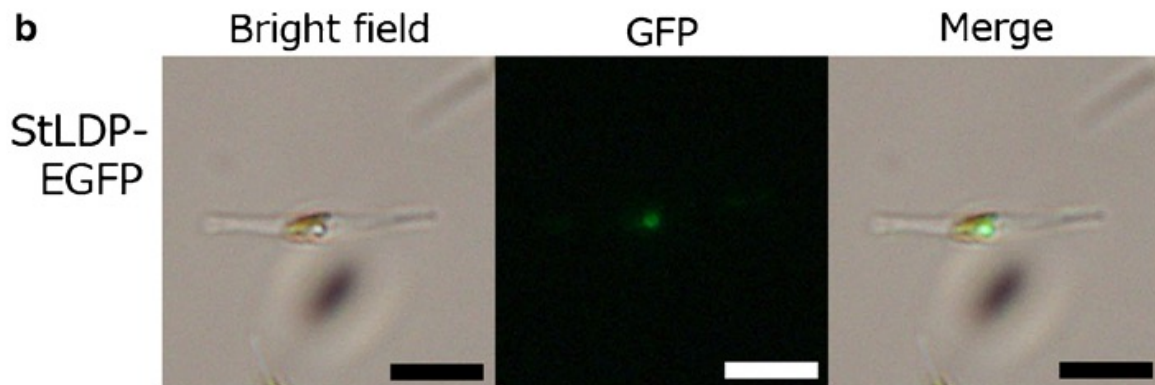


Figure 30 : Localisation de la StLDP à la surface de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum tricornutum*. L'échelle n'est pas indiquée dans la publication. (D'après Yoneda et al., 2018).

Les auteurs ont notamment détecté quatre autres protéines majoritaires putatives dans la fraction enrichie en gouttelette lipidique de *Phaeodactylum* : Une Acyl-CoA-binding protein (Phatr48778), une heat shock protein – HSP70 (Phatr54019) ainsi que deux protéines hypothétiques impliquées dans des réactions redox (Phatr45894 et Phatr49981). La deuxième étude protéomique chez les diatomées concerne la diatomée pennée *Fistulifera solaris* (Nojima et al., 2013). Les auteurs n'ont détecté aucune bande majoritaire et la purification semble comporter des contaminations protéiques. Par soustraction des protéines de la purification des protéines de la fraction soluble, les auteurs ont identifié 14 protéines candidates dont 5 (g4796, g6705, g6574, g4301, g5708) présentent au moins un domaine transmembranaire. Deux protéines candidates (g4301 et g6574) ont été localisées au niveau de la gouttelette lipidique de *Fistulifera solaris* en employant des techniques de fusion GFP. Par comparaison de séquences, les auteurs ont émis l'hypothèse que la protéine g4301 était

peut-être un transporteur de potassium. Par recherche de domaines conservés, la protéine g4301 présente un domaine quinoprotein-alcool deshydrogénase-like détecté dans le protéome de la gouttelette lipidique de la graine de *Camelia sativa* (Jolivet et al., 2013) mais elle ne présente aucun domaine hydrophobe. Les auteurs ont ainsi proposé de nommer cette protéine de 506 acides aminés DOAP1 (Diatom-Oleosome-Associated-Protein 1). Cette même équipe a étudié la localisation subcellulaire d'une fusion entre la GFP et la séquence signal en N-terminal de DOAP1 (Maeda et al., 2014). DOAP1 est initialement présente au niveau du réticulum endoplasmique.

Par comparaison de ces deux études protéomiques, 4 orthologues des protéines de la gouttelette lipidique de *Fistulifera solaris* ont été retrouvées chez *Phaeodactylum tricornutum* : g4796 -> Phatr44488/50592 (protéine transmembranaire), g6574 -> Phatr13578 (canal potassique), g4301 -> Phatr48876 (DOAP1) et g5708 -> Phatr45146 (fonction inconnue) mais aucun d'entre eux n'a été détecté dans le protéome des protéines majeures de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum* (Yoneda et al., 2016). StLDP n'est pas détecté chez *Fistulifera solaris* (Maeda et al., 2017).

Le protéome de la gouttelette lipidique a été également réalisé chez le modèle d'étude *Nannochloropsis oceanica* (Vieler et al., 2012). Ce protéome a permis de mettre en évidence une Lipid Droplet Surface Protein (LDSP) de 16,8 kDa. Cette protéine est présente dans les six espèces de *Nannochloropsis* avec des caractéristiques fonctionnelles proches des oléosines des plantes ainsi que de la MLDP de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Une dernière étude protéomique a été réalisée récemment sur le modèle *Aurantiochytrium limacinum* F26-b, une microalgue unicellulaire non-photosynthétique classée au sein des Straménopiles (ou *Heterokonta*). Cette microalgue est notamment étudiée pour son potentiel biotechnologique car c'est une espèce riche en DHA (22:6) (Dellero et al., 2018a, Dellero et al., 2018b). L'étude protéomique de la fraction de gouttelette lipidique de *A. limacinum* F26-b a permis d'identifier une Thraustochytrid-specific Lipid Droplet Protein 1 (TLDP1) dont la localisation autour de la gouttelette lipidique a été confirmée par l'expression d'une protéine fusion TLDP1-eGFP (Watanabe et al., 2017). Un mutant de *tdp1* montre une diminution de la quantité de TAG et du nombre de gouttelettes lipidiques par cellule. Cependant, des gouttelettes lipidiques plus larges et irrégulières sont observées chez ce mutant. Les auteurs concluent leur étude en suggérant que TLDP1 régule l'accumulation des triacylglycérols ainsi que la taille et le nombre de gouttelettes lipidiques chez *Aurantiochytrium limacinum* F26-b.

Pour conclure, les études de l'architecture des gouttelettes lipidiques des Heterokonta ont aujourd'hui pu permettre de mettre en évidence uniquement des protéines majeures (LDSP,

Données Bibliographiques – Partie 2

StLDP, DOAP1, TLDP1). Ces protéines ont été confirmées à la surface de la gouttelette lipidique par fusion avec des protéines fluorescentes (eGFP). Cependant, les données structurales et fonctionnelles de ces protéines sont aujourd'hui peu abondantes dans la littérature, chez des organismes issus d'une endosymbiose secondaire.

Partie 3 : Les gouttelettes lipidiques, des structures dynamiques

Les gouttelettes lipidiques sont des structures subcellulaires dynamiques, le plus souvent transitoires, rarement stables. Leur élaboration comprend une phase intense de biosynthèse des molécules hydrophobes qui en constituent le cœur (anabolisme) et la biosynthèse et l'agencement de la barrière située en périphérie (une monocouche de lipides polaires, le plus souvent des phosphoglycérolipides ainsi qu'un équipement spécifique de protéines, soit enchassées dans cette monocouche, soit associées de façon plus ou moins transitoire).

1. Anabolisme de la gouttelette lipidique

1.1. Anabolisme des PHA chez les procaryotes

Le cœur hydrophobe des gouttelettes lipidiques décrites principalement chez les procaryotes contient des polyhydroxyalkanolates (PHA) (Cf. **Partie 2**). Selon la longueur de la chaîne de PHA, plusieurs voies de synthèse existent. Pour les PHA à courtes chaînes, une voie directe implique trois enzymes : une β -kétothiolase (PhaA), une acétoacétyl-CoA reductase (PhaB) et une PHA synthase (PhaC). Pour les PHA à chaînes moyennes, plusieurs voies sont possibles (**Figure 31**) :

- Une voie de synthèse impliquant la β -oxydation aboutit à la acylation de R-3-Hydroxyacyl-CoA qui est converti par une PhaC en PHA.
- Une voie de synthèse impliquant une élongation de l'acétyl-CoA, *via* la synthèse *de novo* des acides gras. Cette voie met notamment en lumière la protéine PhaG, une 3-hydroxyacyl-ACP-thioestérase (Wang et al., 2012).
- Une voie de synthèse générant des précurseurs du 3-hydroxyacyl-CoA.

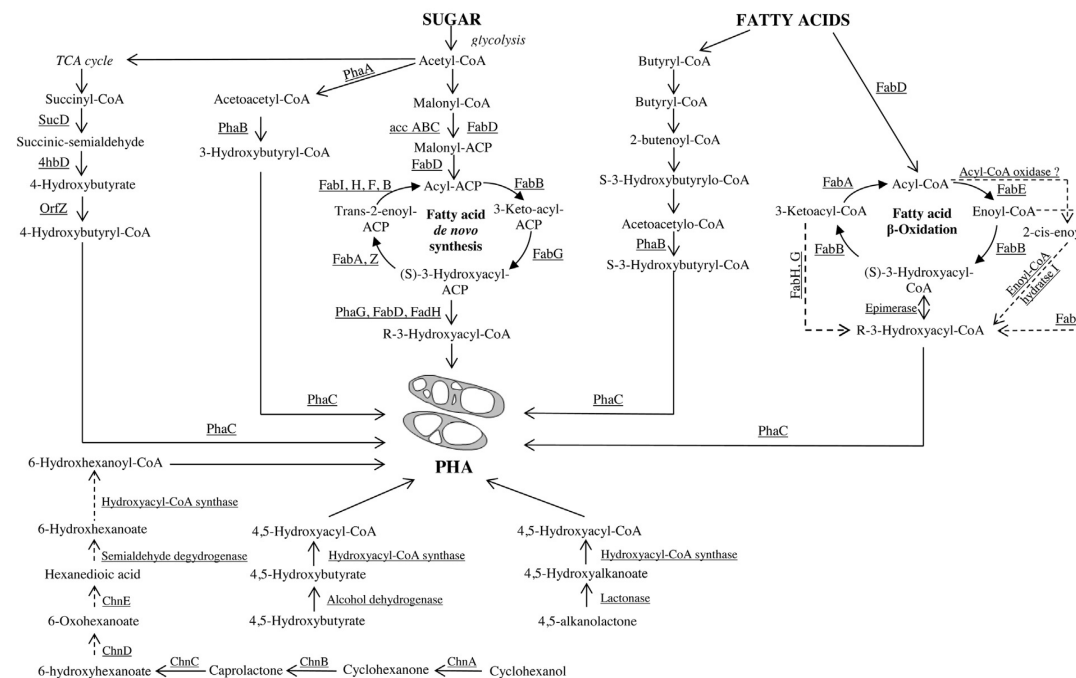


Figure 31 : Voies de synthèse des granules de PHA chez les procaryotes (D'après Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

1.2. Quelques remarques sur l'anabolisme des TAG, composant majeur des gouttelettes lipidiques chez les eucaryotes

Le cœur hydrophobe des gouttelettes lipidiques décrit chez les eucaryotes contient majoritairement des triacylglycérols. Comme nous l'avons évoqué dans la **Partie 1**, la synthèse des triacylglycérols s'effectue dans le réticulum endoplasmique soit par la voie de synthèse de Kennedy, soit par le recyclage de lipides membranaires (recyclage de la PC par la PDAT).

Une troisième voie de biosynthèse des TAG dans le chloroplaste a été également décrite chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Fan et al., 2011) (**Figure 32**). Cette voie a été mise en évidence lors d'une carence en azote chez le mutant BAFJ5, déficient en amidon (Zabawinski et al., 2001, Fan et al., 2011, Goodson et al., 2011) ainsi que la microalgue sauvage dans des conditions de forte lumière (Goold et al., 2016). L'existence de cette voie de synthèse est notamment appuyée par la prédiction de PDAT et de DGAT plastidiales (Vieler et al., 2012). Cependant, l'existence de cette voie de synthèse plastidiale a été remise en question, par des analyses de microscopie électronique (Moriyama et al., 2018). Ces analyses doivent être éclaircies et soulèvent la possibilité d'un flux métabolique du chloroplaste vers la gouttelette lipidique par une association étroite.

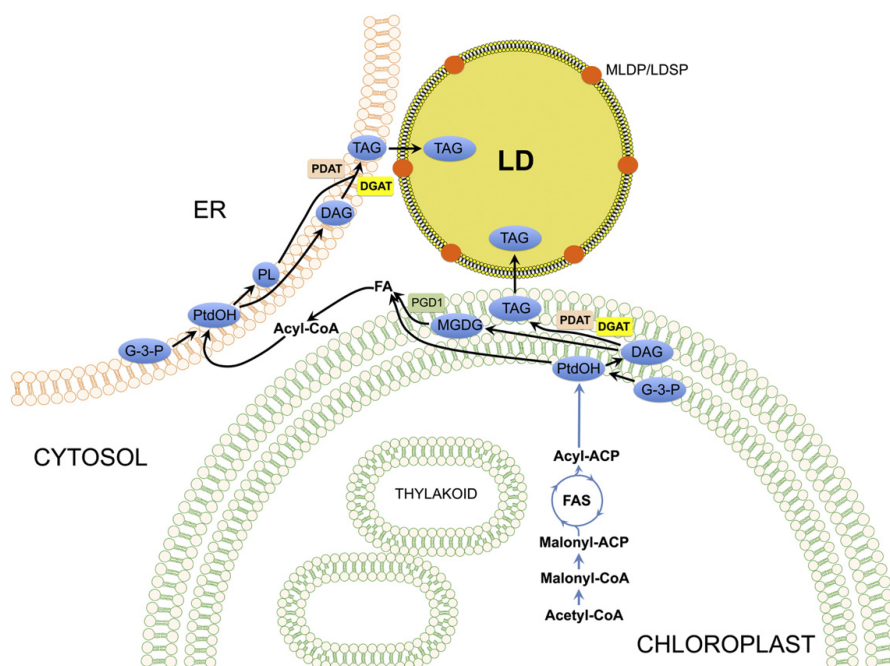


Figure 32 : Modèle de biogénèse des TAG chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce modèle tient compte d'une biogénèse conjointe des TAGs à partir du réticulum endoplasmique (en orange) et du chloroplaste (en vert). ACP, acyl carrier protein ; CoA,

coenzyme A ; DAG, diacylglycérol ; DGAT, acyl-CoA:diacylglycérol acyltransférase ; FA, acides gras ; FAS, Fatty Acid Synthase ; G-3-P, glycerol-3-phosphate ; LD, gouttelette lipidique ; MLDP, Major Lipid Droplet Protein ; LDSP, Lipid Droplet Surface Protein ; PGD1, Plastid Galactolipid Degradation 1 protein ; PtdOH, acide phosphatidique ; PL, phospholipides ; TAG, triacylglycérol. (D'après Zienkiewicz et al., 2016).

Suivant la voie de Kennedy, l'étape finale de la synthèse des TAGs est catalysée par deux catégories de diacylglycerol transférases (les DGAT de type 1 et les DGAT de type 2). Ces enzymes sont critiques pour la synthèse des TAG et leur expression semble particulièrement régulée dans la majorité des études transcriptomiques publiées à ce jour (Alipinah et al., 2015, Longworth et al., 2016). Les DGAT1 sont localisées uniquement au niveau du réticulum endoplasmique alors que les DGAT2 sont à la fois localisées au niveau du réticulum endoplasmique et de la gouttelette lipidique (**Figure 34**). Les DGAT1 et DGAT2 présentent des différences au niveau de leur structure. Les DGAT1 présentent de multiples domaines transmembranaires alors que les DGAT2 possèdent uniquement une boucle hydrophobe insérée dans la bicouche du réticulum endoplasmique (Stone et al., 2006, Wilfling et al., 2013). Les DGAT1 sont capables d'estérifier le MAG, le DAG, le rétinol et les alcools à longues chaînes (Yen et al., 2005). Les DGAT2 utilisent les acides gras issus de la lipolyse pour synthétiser des TAG *de novo* (Qi et al., 2012, Irshad et al., 2017). Le génome de souris ne code que pour une seule DGAT1 et une seule DGAT2. Des souris knock-out pour ces deux enzymes ont été développées. Les souris KO pour DGAT1 sont viables. Ces souris sont amaigries et résistantes au diabète, à la stéatose hépatique et à l'obésité induite (Smith et al., 2000, Chen et al., 2002, Streeper et al., 2012). Le KO DGAT2 chez les souris est létal. Ces souris meurent juste après la naissance suite à un défaut lipidique (absence de TAG) au niveau de la peau, confirmant le rôle de DGAT2 comme un acteur majeur de la synthèse des TAG chez les mammifères (Stone et al., 2004).

En parallèle de la synthèse des TAGs, des acyl-CoA:cholesterol acyltransférases ACAT1 et ACAT2 participent à la synthèse des stérols esters chez les mammifères (Lee et al., 2000).

2. Biogenèse de la gouttelette lipidique

2.1. Biogenèse des granules de PHA chez les procaryotes

Il existe actuellement deux modèles pour la formation *in vivo* des granules de PHA chez les procaryotes (**Figure 33**) :

- un modèle basé sur la formation de micelles de PHA synthèses (PhaC).
- un modèle basé sur le bourgeonnement de granules de PHA à partir de la membrane cytoplasmique.

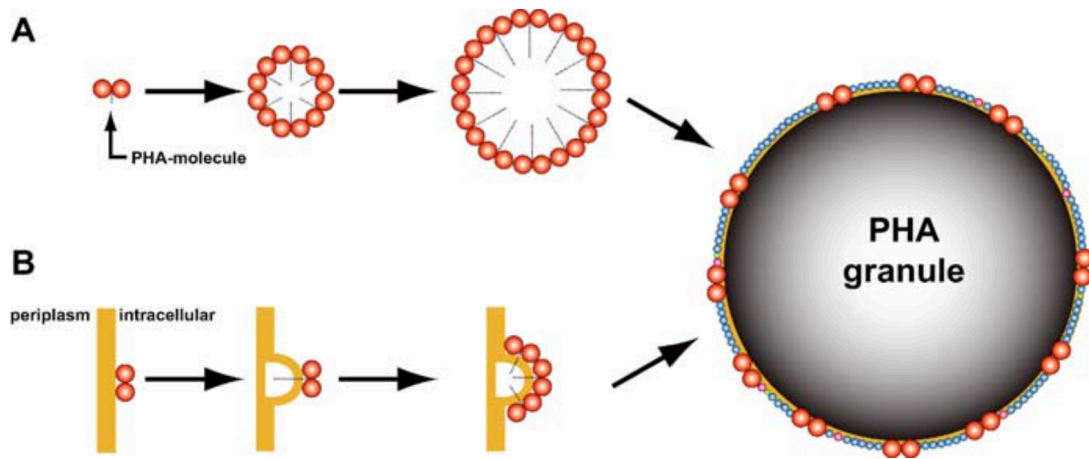


Figure 33 : Deux modèles pour la formation des granules de PHA chez les procaryotes. A : un modèle basé sur la formation de micelles. B : Un modèle par bourgeonnement. Sphères rouges, PHB synthase (PhaC); sphères bleues, phasine (PhaP), sphères violettes, PHA dépolymérase (PhaZ); sphères vertes, répresseurs transcriptionnels de la Phasin (PhaR), ligne jaune : phospholipides (D'après Pötter & Steinbüchel, 2006 et modifié d'après Stubbe & Tian, 2003).

Le modèle basé sur la formation de micelles de PHB synthases est le plus accepté actuellement. Ce modèle part du postulat que les molécules de PHA synthase (PhaC) sont distribuées aléatoirement dans le cytoplasme de la bactérie lorsque les conditions de culture sont normales (Haywood et al., 1989). Lorsque le milieu est favorable à l'accumulation de PHA, la PHA synthase est associée aux granules de PHA. PhaC intervient dans la polymérisation des molécules de HA-CoA. Lorsque la première réaction de polymérisation a lieu, les dimères de PHA s'associent pour former des structures micellaires. PhaC représente la partie hydrophile (en rouge sur la **Figure 33**) et la chaîne de polymère de PHA, la partie hydrophobe. L'augmentation de la chaîne de polymère de PHA et du volume du granule provoque une dispersion des PhaC à la surface des granules de PHA. Ce modèle date de 2006 : il prend en compte la présence d'une monocouche de phospholipides. Les auteurs n'avaient pas d'explications sur la présence de cette monocouche dans le processus de biogénèse de la granule de PHA. La réponse a été obtenue 10 ans plus tard : les granules de PHA sont dépourvus d'une monocouche de phospholipides (Bresan et al., 2016).

Le deuxième modèle propose une libération de la PHB synthase à partir de la bicouche phospholipidique de la membrane cytoplasmique. Ce modèle est proche du modèle de formation des gouttelettes lipidiques chez les organismes eucaryotes. Le granule de PHB grandit jusqu'à être libéré dans le cytoplasme de la bactérie. Les protéines spécifiques des granules de PHB sont ensuite attachées à la surface des granules de PHB. Cependant, ce modèle est peu réaliste car il ne tient pas compte du fait que les PHB synthases et les

phasines ne sont jamais localisées au niveau de la membrane cytoplasmique (Pötter & Steinbüchel, 2006).

2.2. Biogenèse des gouttelettes lipidiques riches en TAG chez les eucaryotes

Les principes généraux du mécanisme de biogenèse semblent conservés entre les organismes animaux et végétaux (Cf. **Discussion générale**). Suite à la synthèse des TAG dans le réticulum endoplasmique (Cf. **Partie 1**), une « lentille » de lipides neutres (TAGs et stérol esters) se développe au sein de la bicouche du réticulum endoplasmique au niveau de sites de nucléation particulier (**Figure 34**). Nous aborderons les détails biophysiques de ce mécanisme dans la **Partie 4**. Les modèles de nucléation actuels montrent que l'hétérogénéité de la bicouche de phospholipides du réticulum endoplasmique, la courbure du réticulum endoplasmique, la localisation des sites de synthèses des TAGs (DGAT) et des protéines peuvent être impliqués dans la formation de la lentille (Thiam & Forêt, 2016).

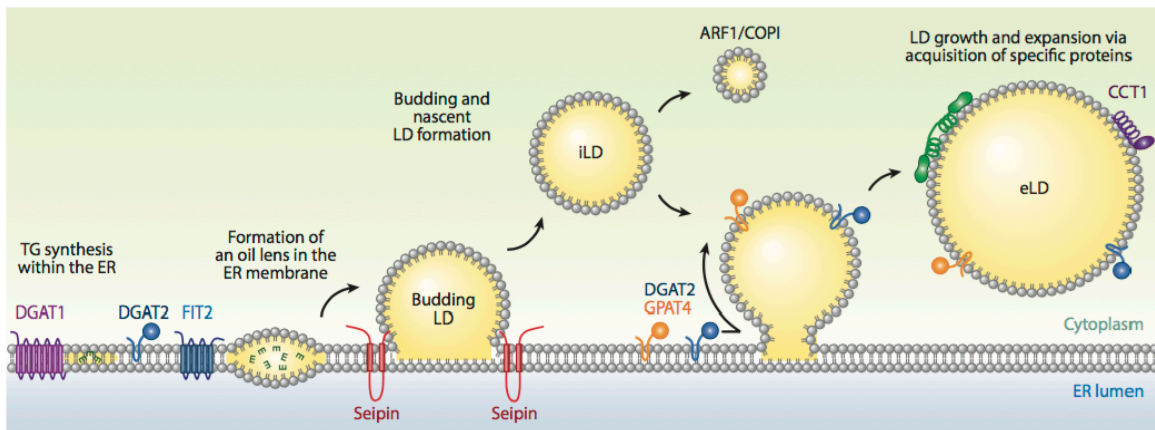


Figure 34 : Mécanisme général de biogenèse de la gouttelette lipidique chez les eucaryotes. Le mécanisme est décrit dans le texte. CCT1, CTP:phosphocholine cytidyltransférase 1 ; DGAT1, acyl-CoA:diacylglycérol acétyltransférase 1 ; DGAT2, acyl-CoA:diacylglycérol acétyltransférase 2 ; FIT2, Fat inducing transcript 2 ; GPAT4, glycérol-*sn*-3-phosphate acyl-transférase 4. (D'après Walther et al., 2017).

FIT2 (Fat-inducing transcript 2) est une protéine du réticulum endoplasmique impliqué dans la biogenèse de la gouttelette lipidique (Gross et al., 2011). Il existe deux protéines FIT chez l'humain : FIT1 localisée dans les muscles et FIT2 exprimée ubiquitairement. Cette protéine possède de multiples domaines transmembranaires liés à la formation de la gouttelette lipidique (Kadereit et al., 2008, Choudhary et al., 2015). Plusieurs expériences de génies génétiques ont été réalisées pour caractériser fonctionnellement cette protéine. Une délétion de FIT2 dans les entérocytes de souris provoque l'absence d'accumulation de gouttelettes lipidiques et un dysfonctionnement du système intestinal (Goh et al., 2015). Un knockdown (KD) de FIT2 dans le tissu adipeux de la souris provoque une lipodystrophie et une résistance à l'insuline (Miranda et al., 2014). L'utilisation de petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) pour invalider l'expression de la protéine FIT2 d'adipocytes 3T3-L1 (*gene silencing*)

induit un blocage de l'accumulation de gouttelettes lipidiques (Kadereit et al., 2008). Un KD de la protéine FIT2 chez le poisson-zèbre *Danio rerio* bloque également l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans le foie et l'intestin (Kadereit et al., 2008).

Suite à la formation de cette lentille, un bourgeonnement de la gouttelette lipidique s'effectue du côté cytoplasmique du réticulum endoplasmique (**Figure 34**, « Budding LD »). Ce bourgeonnement polarisé de la gouttelette lipidique suit un mécanisme inconnu. Il a été proposé que FIT2 serait impliqué dans la polarisation du bourgeonnement (Choudhary et al., 2016).

Une augmentation de l'angle de contact α (cf. **Partie 4**) entre la gouttelette lipidique et la bicouche du réticulum provoque la fission de la gouttelette. Ce mécanisme fait également intervenir des protéines à la surface du réticulum. Un candidat intéressant est la protéine Seipin localisée au niveau du réticulum présentant deux domaines transmembranaires et une boucle luminale (Lundin et al., 2006) (**Figure 35**).

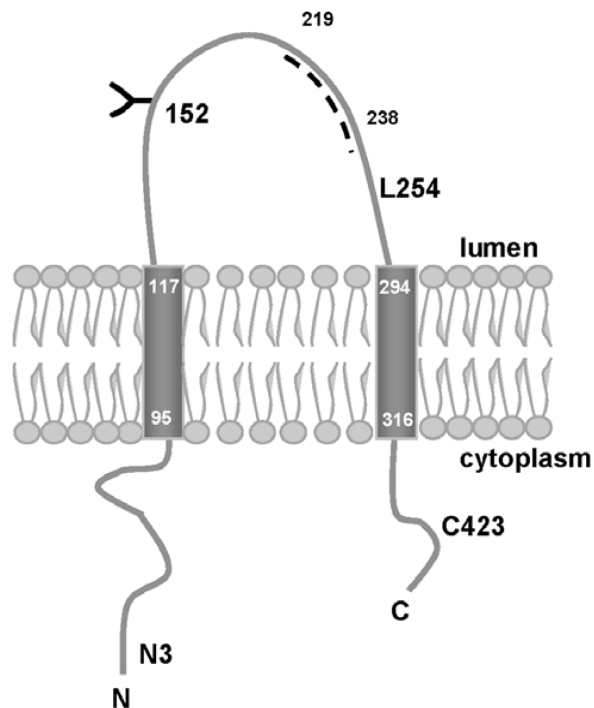


Figure 35 : Topologie de la protéine Seipin humaine. Les sites de glycosylation analysés expérimentalement sont indiqués. (D'après Lundin et al., 2006).

Comme nous l'avons évoqué dans la **Partie 2**, la Seipin (BSCL2) est une protéine déficiente dans certaines lipodystrophies congénitales (Magré et al., 2001). La Seipin est impliquée fonctionnellement dans les étapes initiales de la formation de la gouttelette lipidique en générant des structures naissantes ou en participant à leur maturation en gouttelette lipidique mature (**Figure 36**). Un crible morphologique des gouttelettes lipidiques de *Saccharomyces cerevisiae* montre que l'homologue Fld1 de la Seipin est nécessaire pour la

formation de gouttelettes « normales ». Selon les conditions de culture, la délétion de Fld1 engendre l'accumulation de petites gouttelettes lipidiques ou au contraire de gouttelettes géantes (Szymanski et al., 2007, Fei et al., 2008). Cette protéine participe également à la stabilisation des sites de contact entre le réticulum endoplasmique et la gouttelette lipidique (Grippa et al., 2015, Salo et al., 2016, Wang et al., 2016). La Seipin est également impliquée dans la régulation de la synthèse des TAG : elle interagit notamment avec la GPAT, AGAT2 et les lipines (phosphatidates phosphatases recrutées pour la synthèse de DAG, servant de substrat à la production de TAG). Un seul gène de Seipin est détecté chez les animaux et les fungi contre trois homologues (Seipin1, Seipin2, Seipin3) chez les plantes supérieures. Seipin1 est exprimée exclusivement dans les embryons d'*Arabidopsis* alors que Seipin2 et Seipin3 sont exprimées plus largement, avec un niveau d'expression maximal dans les embryons et le pollen. Les Seipins sont divisées en deux groupes monophylétiques chez les plantes selon leurs degré de spécialisation fonctionnelle, Seipin1 dans un premier groupe et Seipin2 et 3 dans un second groupe (Cai et al., 2015).

Une étude de génétique fonctionnelle montre que la double mutation seipin s2s3 et la triple mutation s1s2s3 provoquent l'accumulation de gouttelettes lipidiques plus larges que la moyenne dans la graine et le pollen d'*Arabidopsis*, bloquant leur mobilisation lors de la germination (Taurino et al., 2017). Cette étude révèle aussi la présence, par microscopie électronique à transmission, de gouttelettes lipidiques nucléaires reliées au réticulum nucléoplasmique de type I, dans les triples mutants Seipin (Taurino et al., 2017). Le réticulum nucléoplasmique correspond à des convolutions de l'enveloppe nucléaire, formant des invaginations profondes et ramifiées. Il est observable uniquement par des techniques d'imageries tridimensionnelles (Echevarria et al., 2003, Schneider et al., 2010, Malhas et al., 2011).

Un orthologue de la Seipin (*PtSeipin* – Phatr3_J47296) a été détecté chez *Phaeodactylum tricornutum* (Lu et al., 2017). La surexpression de la Seipin chez *Phaeodactylum* provoque une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques, de la quantité en lipides neutres (57% d'augmentation) et de la proportion des acides gras saturés (16:0).

Les gouttelettes lipidiques peuvent se détacher du réticulum, formant une population de gouttelettes lipidiques initiales (iLD) mesurant 400 à 800 nm de diamètre. Ces gouttelettes lipidiques peuvent être par la suite converties, suivant un mécanisme inconnu, en une nouvelle population de gouttelettes lipidiques appelées gouttelettes lipidiques en expansion (eLD). Il existe donc deux populations de gouttelettes lipidiques au sein des organismes *Opisthokonta*. Les eLD correspondent à des iLD qui se sont spécialisés notamment par l'acquisition d'une synthèse de TAG indépendante s'effectuant par la GPAT4 et la DGAT2

(Kuerschner et al., 2008, Stone et al., 2009, Wilfling et al., 2013). Ces deux protéines initialement présentes au niveau du réticulum endoplasmique sont relocalisées vers la gouttelette lipidique (Wilfling et al., 2013).

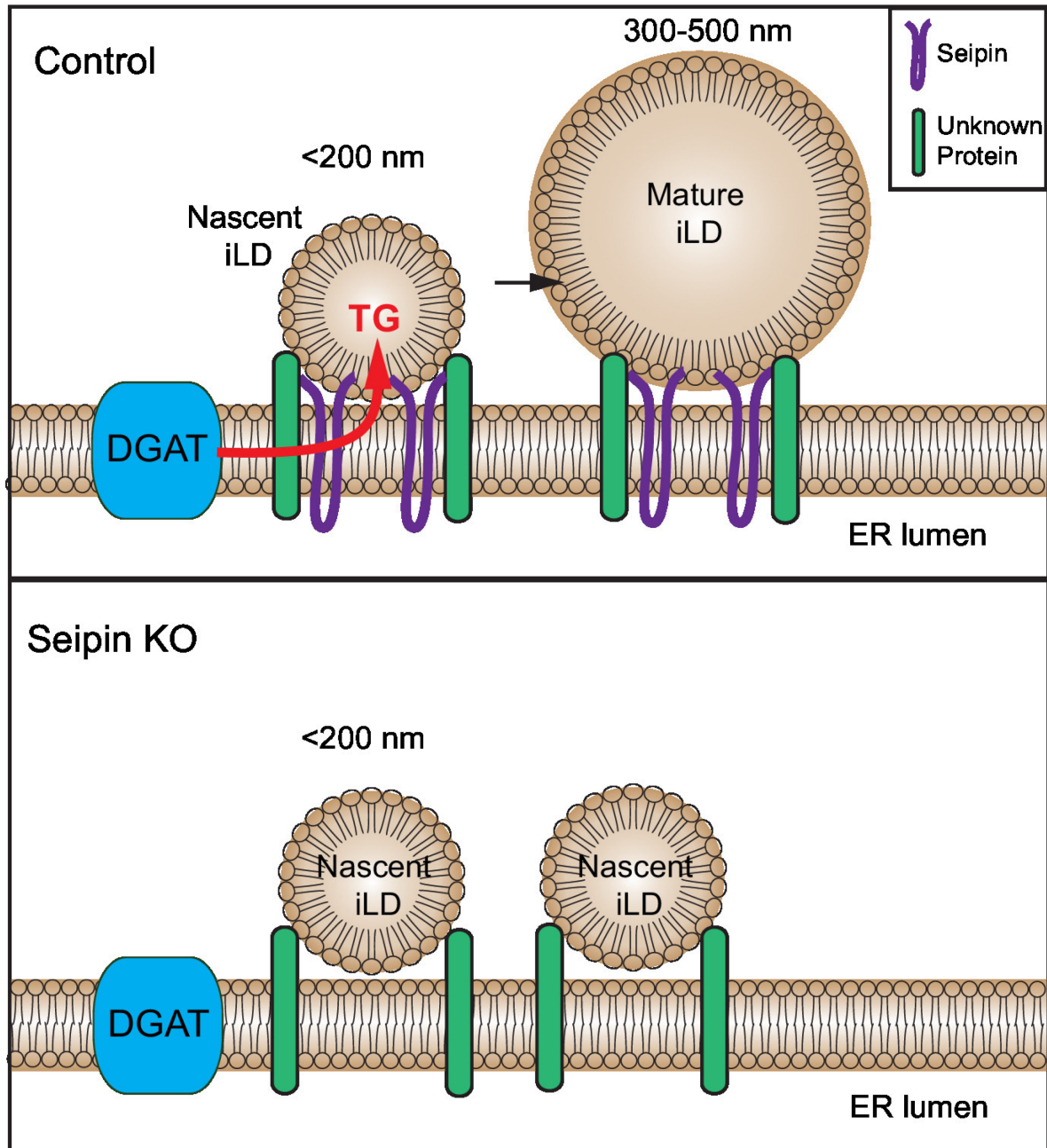


Figure 36 : Mode d'action de la Seipin. Les oligomères de Seipin se localisent au niveau des sites de contact entre les gouttelettes lipidiques naissantes et le réticulum endoplasmique favorisant le transfert des triacylglycerols (TG) aux gouttelettes lipidiques naissantes pour former des gouttelettes lipidiques matures. Un KO de la Seipin provoque une inhibition du transfert des TAG, un arrêt de croissance des gouttelettes lipidiques et une accumulation de gouttelettes lipidiques naissantes. Le maintien du site de contact entre la gouttelette lipidique naissante et le réticulum endoplasmique ne requiert pas la Seipin (D'après Wang et al., 2016).

Le mécanisme de conversion est certes inconnu, il existe tout de même des données montrant que la machinerie vésiculaire ARF1/COP1 est impliquée dans ce processus. Il a

été notamment montré dans un système *in vitro* que la machinerie ARF1/COP1 permet la synthèse de nano gouttelettes lipidiques de 60 à 80 nm (Thiam et al., 2013a).

COP1 (Coat Proteins type I) est un complexe protéique, composé de sept sous-unités (α , β , β' , γ , ϵ , δ , ζ), responsable du transport vésiculaire rétrograde de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique ainsi que du transport intra-Golgi (Beck et al., 2009, Jackson, 2014) (**Figure 37**). ARF1 (ADP Ribosylation Factor 1) est un membre de la famille des protéines de liaison à la GTP de la superfamille Ras (petites GTPases). La protéine ARF1 est localisée dans l'appareil de Golgi et joue un rôle central dans le transport intra-Golgi. Les protéines ARF1-GDP sont inactives dans le cytosol. Le mécanisme commence par l'échange du GDP d'une ARF en GTP catalysé par une Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) présentant un large domaine Sec7 appelé GBF1 (Golgi-specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange Factor) (Chardin et al., 1996, Zhao et al., 2002, Niu et al., 2005). ARF1-GTP devient active et change de conformation favorisant son ancrage dans la membrane par une hélice amphipathique N-terminale myristoylée (Franco et al., 1996, Antonny et al., 1997, Liu et al., 2009). Une dimérisation de ARF1-GTP est nécessaire pour la formation des vésicules (Beck et al., 2008). L'ensemble de ce mécanisme permet le recrutement du complexe COP1 à la membrane (Serafini et al., 1991, Donaldson et al., 1992, Palmer et al., 1993). Les protéines cargo présentant un peptide signal KDEL (Lysine - Acide Aspartique - Acide Glutamique - Leucine) chez les mammifères ou HDEL (Histidine - Acide Aspartique - Acide Glutamique - Leucine) chez *Saccharomyces cerevisiae* en C-terminal. Cette étiquette permet la reconnaissance des protéines cargo par le récepteur KDELR (KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptors) au niveau du *cis*-Golgi (Lewis & Pelham, 1990). L'ensemble de ces étapes initie le bourgeonnement de la membrane du Golgi pour la formation de la vésicule COP1. La fission complète de la vésicule COP1 pourrait impliquer des lipides pouvant induire une courbure négative, comme l'acide phosphatidique ou le DAG (Shemesh et al., 2003). Il a été montré que le taux d'acide phosphatidique diminuait pendant le mécanisme de bourgeonnement suggérant qu'il n'est pas impliqué dans le processus (Stamnes et al., 1998). L'acide phosphatidique est converti en DAG par l'action des phosphatidates phosphohydrolases (PAP). Une inhibition des PAPs, par le propranolol, entraîne une diminution de la synthèse de DAG et un arrêt de la formation de vésicules COP1 (Fernandez-Ulibarri et al., 2007, Asp et al., 2008). Les protéines cargo sont transportées vers le réticulum endoplasmique ou elles fusionneront avec la membrane du réticulum.

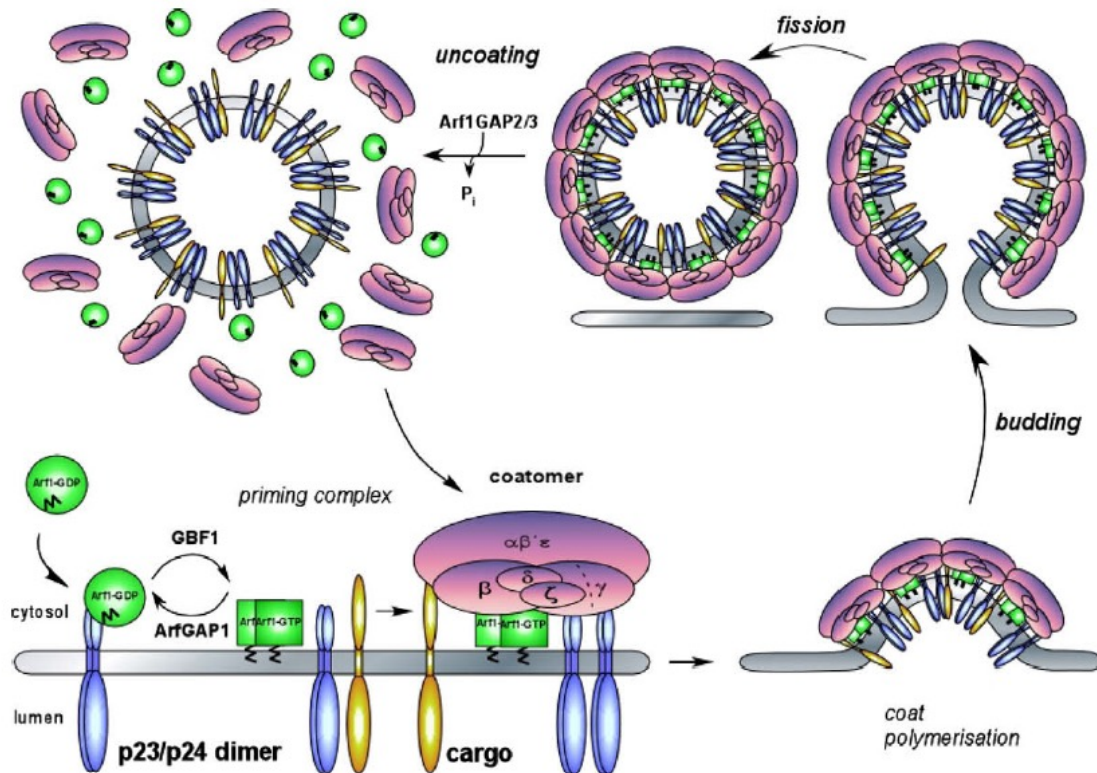


Figure 37 : Formation du complexe ARF1/COP1 pour le transport vésiculaire rétrograde. Le mécanisme est décrit dans le corps du texte. . Le rôle de COP1 dans la formation de nano-gouttelettes repose vraisemblablement sur certaines propriétés qui régissent ce type de bourgeonnement vésiculaire. Le mécanisme précis reste à élucider. Une partie de ce mécanisme semble impliquer un contrôle de la lipase ATGL par ARF1/COP1 (Soni et al., 2009). GBF1, Golgi-specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange Factor ; ARF1, ADP Ribosylation Factor 1 ; COP1 : Coatomer Protein 1 (D'après Beck et al., 2009).

3. Catabolisme de la gouttelette lipidique

3.1. Une régulation lipidique par la β -oxydation

Le catabolisme de la gouttelette lipidique correspond à l'hydrolyse des molécules de triacylglycérol en glycérol + 3 acides gras chez les eucaryotes ou à la dégradation des granules de polyhydroxyalkanolates chez les procaryotes. Dans l'ensemble des cas, le catabolisme de la gouttelette lipidique et des granules de PHA fait intervenir le mécanisme de la β -oxydation (**Figure 38**). La β -oxydation est une voie métabolique de dégradation des acides gras produisant de l'acétyl-CoA ainsi que du pouvoir réducteur (NADH et FADH₂). Cette voie métabolique s'effectue dans la matrice mitochondriale chez les *Mammalia* et dans le peroxysome (ou glyoxysome) chez les organismes végétaux. Les acides gras à courtes chaînes (présentant moins de 8 carbones) sont dégradés dans la mitochondrie alors que les acides gras à moyennes et très longues chaînes (supérieure à 8 carbones) sont dégradés dans le peroxysome (Wanders et al., 2015, Dellerio et al., 2018a). L'activation et le transport des acides gras constituent deux étapes préliminaires indispensables avant l'initiation de la

β -oxydation. L'activation de la dégradation des acides gras est réalisée par une long chain acyl-CoA ligase (appelé également acyl-Coenzyme A synthétase) en présence d'ATP formant un acyl-CoA + AMP + P_{Pi}. Le pyrophosphate (P_{Pi}) est hydrolysé dans le cytosol. Pour rejoindre la mitochondrie, l'acyl-CoA doit emprunter la navette carnitine. La réaction s'effectue en deux étapes : l'acyl-CoA est converti en acyl-carnitine sur la membrane mitochondriale externe par la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1). L'acylcarnitine pénètre dans l'espace intermembranaire mitochondrial grâce à une porine, puis rejoint l'espace mitochondrial interne en empruntant une carnitine-acylcarnitine translocase (CACT). La CACT échange un acyl-carnitine de l'espace intermembranaire mitochondrial contre une carnitine provenant de la matrice mitochondriale. Un acyl-CoA est libéré de la molécule de carnitine par l'action d'une carnitine palmitoyltransférase 2 (CPT2).

Dans le peroxysome, le transport de l'acyl-CoA est réalisé par un transporteur ABC (ATP Binding Cassette) de classe D. La β -oxydation s'effectue en quatre étapes dans la mitochondrie et le peroxysome. La première étape diffère entre les deux compartiments. En effet, dans le cas de la mitochondrie, l'acyl-CoA est deshydrogéné par le FAD dans une réaction catalysée par une acyl-CoA deshydrogénase. Dans le peroxysome, cette réaction est réalisée par une acyl-CoA oxydase. Dans les deux cas, le produit terminal est le *trans*- Δ^2 -énoyl-CoA (noté Enoyl-CoA sur la **Figure 38**). Dans la mitochondrie, cette réaction libère du FADH₂ qui sera oxydé par la chaîne respiratoire alors que dans le peroxysome, cette réaction produit du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ qui sera dismuté en eau et oxygène par la catalase. Le *trans*- Δ^2 -énoyl-CoA est ensuite hydraté par une enoyl-CoA hydratase (ECH) formant le 3-hydroxyacyl-CoA. Le 3-hydroxyacyl-CoA est ensuite oxydé par une hydroxyacyl-CoA-Déshydrogénase (HADH) NAD⁺- dépendante, formant du 3-ketoacyl-CoA. La dernière étape correspond à une réaction de thiololyse réalisée par une acétyl-CoA acyltransférase (ACAA) conduisant à la formation d'un acyl-CoA qui sera dégradé par la β -oxydation et d'un Acétyl-CoA qui pourra être dégradé par le cycle de Krebs, être utilisé pour la synthèse de corps cétoniques (acétylacétate, acétone ou le β -D-hydroxybutyrate) ou ré-utilisé pour la synthèse d'acides gras. L'ensemble de ces réactions est appelé l'hélice de Lynen, raccourcissant l'Acyl-CoA de deux carbones par tour d'hélice.

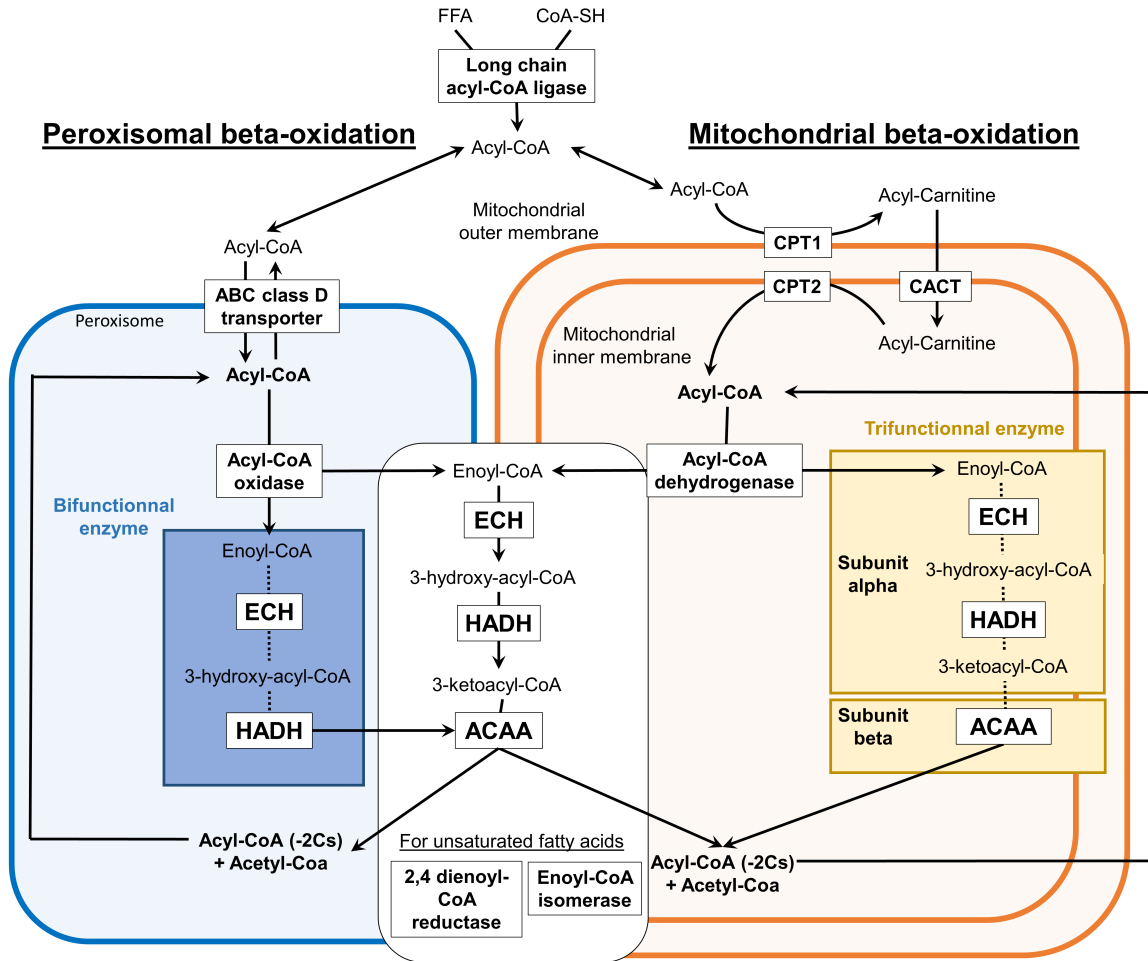


Figure 38 : La β -oxydation peroxysomale et mitochondriale. Le fonctionnement de la β -oxydation est décrit dans le corps du texte. ECH, enoyl-CoA hydratase ; HADH, hydroxyacyl-CoA déshydrogénase ; ACAA, acétyl-CoA acyltransférase ; CPT1, carnitine palmitoyltransférase 1 ; CPT2, Carnitine palmitoyltransférase 2 ; CACT, carnitine-acylcarnitine translocase ; FFA, acides gras libres. (D'après Dellerio et al., 2018).

3.2. Une régulation protéique par la machinerie ERAD et le protéasome 26S

Les protéines de la gouttelette lipidique sont également régulées par une voie localisée au niveau du réticulum endoplasmique : la voie ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation). Au cours de leur synthèse, les protéines porteuses d'un peptide signal sont importées par un translocon (Sec61 par exemple) (Figure xx) dans le réticulum endoplasmique (Rapoport, 2007) où elles subissent des modifications co et post-traductionnelles (clivage d'un peptide signal, N-glycosylation et formation de ponts disulfures). La machinerie ERAD constitue un contrôle qualité des protéines « importées » dans le réticulum mais également un contrôle de leur quantité (**Figure 40a**) (Olzmann et al., 2013a). La présence de mutations, d'erreurs de transcription et de traduction peut empêcher la protéine d'aboutir à une conformation native.

La machinerie ERAD opère en trois étapes :

- 1) La reconnaissance de protéines mal repliées ou mutées dans le réticulum endoplasmique. La présence de résidus Cystéine mal appariés, de glycanes immatures ou de régions hydrophobes exposées sont des exemples de problèmes ciblés par des protéines chaperones. La reconnaissance de régions hydrophobes exposées est effectuée, par exemple, par des protéines chaperones de la lumière du réticulum (ER luminal binding protein - BIP) ou cytosoliques (Heat Shock Protein 70 – Hsp70) (Okuda-Shimizu & Hendershot, 2007).
- 2) La rétrotranslocation vers le cytosol. Le système ubiquitine-Protéasome 26S (UPS) est localisé dans le cytosol nécessitant un transport des protéines mal repliées du réticulum endoplasmique vers le cytosol. Un exemple connu de protéine participant à la translocation est la Valosin-containing-protein (VCP ou p97) chez les mammifères ou CDC48 (Cell Division Cycle 48 protein) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Meyer et al., 2012).
- 3) La dégradation dépendante de l'ubiquitine par le protéasome 26S. Une protéine mal repliée peut être ubiquitinée par une série de réactions présentée dans la **Figure 39**. L'ubiquitine est une protéine conservée chez les eucaryotes de 76 acides aminés (8 kDa) (Hershko et al., 2000). A l'issue de ce mécanisme, la protéine polyubiquitinée est reconnue par le protéasome 26S (composé d'un cœur catalytique en forme de baril 20S au centre et de deux complexes régulateurs 19S à chaque extrémité) où elle sera dégradée (pour revue, Sharma et al., 2016).

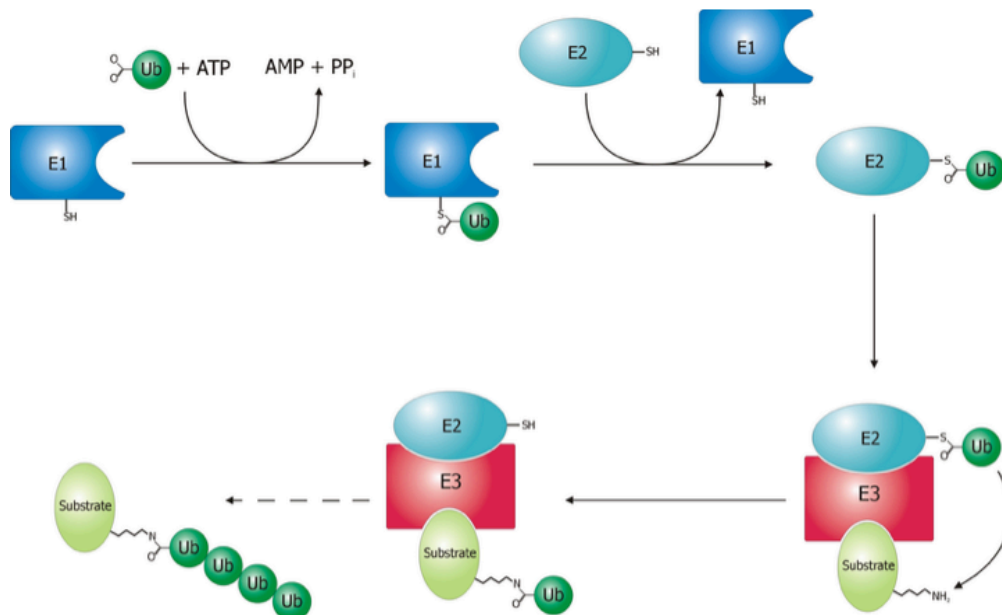


Figure 39 : Mécanisme général d'ubiquitination. Le processus d'ubiquitination fait intervenir trois ligases E1, E2 et E3. L'enzyme d'activation E1 (bleu foncé) catalyse l'activation du système Ubiquitine-protéasome par adénylation en C-terminal du groupement carboxyl de l'ubiquitine (vert foncé). L'ubiquitine activée est transférée de E1 vers un résidu cystéinyle de l'enzyme de conjugaison E2 (turquoise). L'ubiquitine ligase E3 (rouge) reconnaît le substrat (vert clair). Le complexe E2-Ub est transféré sur l'ubiquitine ligase E3.

L'ubiquitination du substrat peut-être direct par transfert de l'ubiquitine sur le substrat ou par modification par une enzyme de conjugaison E2 qui forme une liaison thioester facilitant l'appariement de l'ubiquitine au substrat. La polyubiquitination est réalisée par l'ubiquitine ligase E3 permettant la reconnaissance du substrat par le protéasome 26S. (Figure provenant de la page anglaise Wikipedia de l'ubiquitine :

<https://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin#/media/File:Ubiquitylation.svg>)

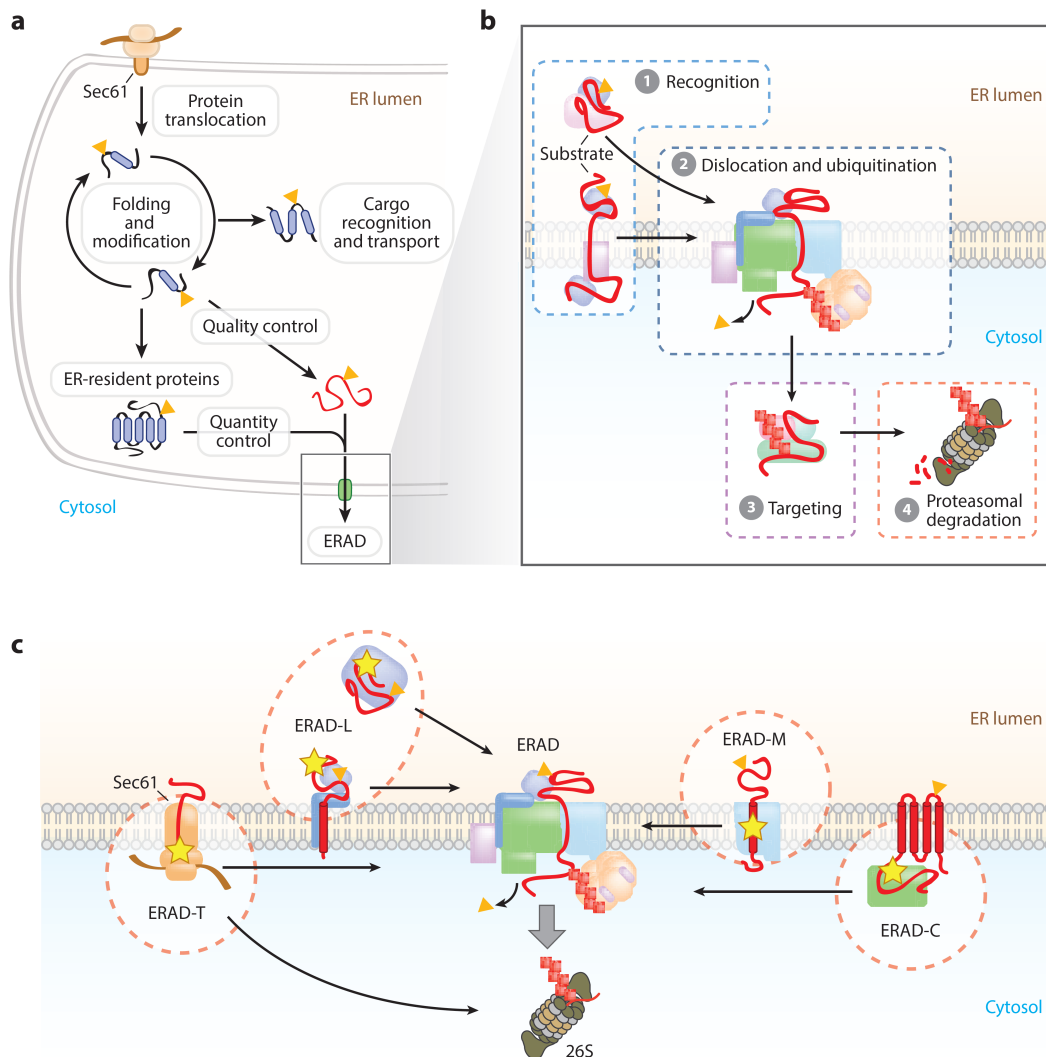


Figure 40 : Mécanismes de contrôle de la qualité et de la quantité de protéines dans le réticulum endoplasmique (RE).

a. Repliement et maturation des protéines dans le RE. Les protéines insérées dans le RE par le translocon Sec61 sont sujettes à un repliement co-traductionnel et post-traductionnel. Les protéines qui ont atteint leur conformation native sont reconnues et transportées vers leur destination cellulaire finale. Les protéines qui ne parviennent pas à obtenir leur conformation appropriée sont orientées vers une voie de dégradation associée aux ER (ERAD) (contrôle de la qualité). Les niveaux de certaines protéines correctement repliées sont également contrôlés par une dégradation régulée par ERAD (contrôle de quantité). **b. Mécanismes séquentielles de la voie ERAD:** 1, reconnaissance du substrat ; 2, dislocation et conjugaison de l'ubiquitine et 3, ciblage des protéines ubiquitinées sur le protéasome pour la protéolyse. **c. Le système ERAD comprend de multiples voies qui interviennent dans la reconnaissance et la dégradation des substrats présentant des topologies diverses.** Ces voies sont généralement désignées en fonction de l'emplacement du signal de dégradation du substrat:

luminal (ERAD-L), cytosolique (ERAD-C), membranaire (ERAD-M) ou translocon (ERAD-T). L'étoile jaune indique un signal de dégradation et le triangle jaune indique un N-glycane. (D'après Stevenson et al., 2016).

3.3. Des exemples de régulation du catabolisme de la gouttelette lipidique

3.3.1. Chez les procaryotes producteurs de PHA

La dégradation des granules de PHA est réalisée par une PHA dépolymérase (PhaZ) (Kobayashi et al., 2003, Uchino et al., 2008). PhaZ présente donc un rôle analogue aux acyl-lipases chez les eucaryotes, que nous allons présenter dans le prochain paragraphe. Deux voies de dégradation des granules de PHA existent chez les procaryotes :

- une voie extracellulaire impliquant des bactéries pouvant sécréter des dépolymérase dans l'environnement.
- une voie intracellulaire, moins bien connue à ce jour.

Sept PHB dépolymérase intracellulaires (PhaZ1 à PhaZ7) ainsi que deux PHB hydrolases (PhaY1, PhaY2) ont été décrites chez le modèle *R. eutropha* H16 (Abe et al., 2005, Uchino et al., 2008, Sznajder & Jendrossek, 2014). Cependant, PhaZ1 semble être la seule PHB dépolymérase active chez *R. eutropha* H16 (Sznajder & Jendrossek, 2014). PhaZ1 présente une cystéine dans le site catalytique de la « boîte » lipase. La thiololyse des granules de PHB en (R)-3-hydroxybutyryl-CoA par la PhaZ1 a été démontrée (Eggers & Steinbüchel, 2013) Le modèle mécanistique de dégradation des granules de PHB est présenté dans la **Figure 41**. La localisation de PhaZ1 a été confirmée à la surface des granules de PHB par fusion avec la eYFP (Uchino et al., 2008).

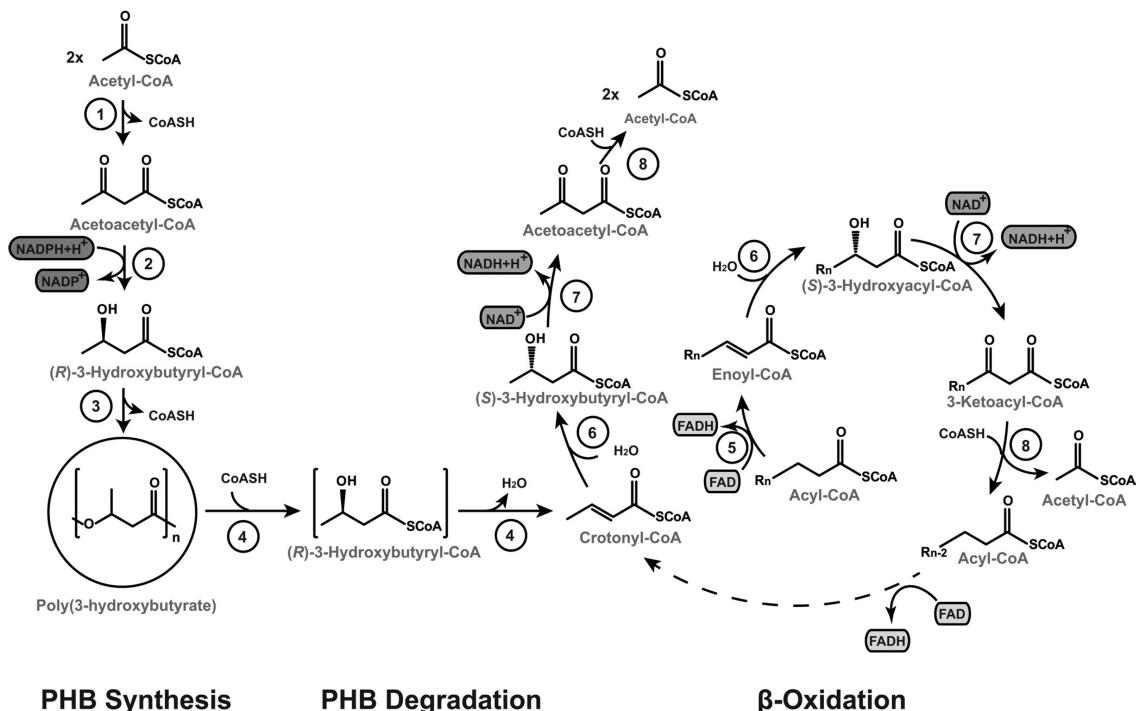


Figure 41 : Un modèle de synthèse et de dégradation des granules de PHB de *R.eutropha* H16. Le PHB est synthétisé par condensation de deux molécules d'acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA par une cétothiolase (PhaA) (1) et réduction par une acétoacétyl-CoA réductase (PhaB) (2) dans une réaction dépendante de NADPH de l'acétoacétyl-CoA en (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. La PHA synthase (PhaC) (3) incorpore les monomères au poly (R)-3-hydroxybutyrate. Le PHB est dégradé en crotonyl-CoA *via* le (R)-3-hydroxybutyryl-CoA dans une réaction thiolytique par les PHB dépolymérase intracellulaires (PhaZ) (4), probablement sans libération de l'intermédiaire (crochets). Une double liaison est ajoutée à un acyl-CoA par une acyl-CoA déshydrogénase (FadE) (5) formant un énoyl-CoA. L'énoyl-CoA est converti de manière stéréospécifique en (S)-3-hydroxyacyl-CoA par une énoyl-CoA hydratase (FadB multifonctionnelle) (6) et un 3-cétoacyl-CoA est formé suivant une réaction dépendante du NAD par une 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (enzyme multifonctionnelle FadB) (7). Une 3-cétoacyl-CoA thiolase (FadA) (8) clive la 3-cétoacyl-CoA et une molécule d'acétyl-CoA est formée, donnant un acyl-CoA tronqué. Le cycle d'oxydation reprend avec l'ajout d'une double liaison à l'acyl-CoA tronqué. (D'après Eggers & Steinbüchel, 2013).

3.3.2. Chez les *Mammalia* (*Opisthokonta*)

3.3.2.1. La remobilisation des acides gras

L'hydrolyse des TAGs et la remobilisation des acides gras est un processus indispensable pour assurer des fonctions de signalisation mais également pour la β -oxydation des acides gras (lipolyse) dans les mitochondries et/ou les peroxysomes. La lipolyse chez les mammifères fait intervenir différents acteurs protéiques :

- la protéine CGI-58 (appelé ABDH5 dans la **Figure 42**) interagit avec l'extrémité C-terminal de PLIN1a (variant d'épissage de PLIN1) à la surface de la gouttelette lipidique des adipocytes (Subramanian et al., 2004). PLIN1a est exprimée presque exclusivement dans les adipocytes et les cellules stéroïdogènes au niveau des gouttelettes lipidiques mais également au niveau du réticulum endoplasmique (Skinner et al., 2013).
- L'Adipose Triacylglycérol Lipase (ATGL) est également localisée au niveau de la gouttelette lipidique. Avant que le processus de lipolyse ne se mette en place, l'activité enzymatique d'ATGL est très faible à la surface de la gouttelette lipidique. La majorité des protéines ATGL est localisée dans le cytosol de l'adipocyte avant la lipolyse.
- L'activité d'ATGL est inhibée par la protéine G0/G1 switch protein 2 (G0S2) atténuant ainsi l'activité de la lipolyse de façon dose-dépendante (Yang et al., 2010, Schweiger et al., 2012). G0S2 est une protéine avec une courte durée de vie induite notamment par l'insuline (Nielsen et al., 2014).

La lipolyse est initiée par une stimulation β -adrénergique (exercice physique, carence nutritionnelle). L'adénylate cyclase (AC) est activée par une sous unité α d'une protéine G hétérotrimérique entraînant une accumulation d'AMPc activant une protéine kinase A (PKA)

(Viswanadha & Londos, 2008). A l'inverse, la lipolyse activée par les catécholamines peut être inhibée par l'insuline (Degerman et al., 1998).

PLIN1 est phosphorylée par une protéine kinase A (PKA) sur le résidu Ser⁵¹⁷ (Granneman et al., 2009). L'association d'ATGL aux gouttelettes lipidiques est dépendante de la machinerie vésiculaire ARF1/COP1 (Soni et al., 2009). La phosphorylation entraîne la libération de CGI-58 qui se lie ensuite à ATGL à la surface de la gouttelette lipidique. La PKA phosphoryle également CGI-58 sur le résidu Ser²³⁹ favorisant ainsi la liaison de CGI-58 à ATGL (Sahu-Osen et al., 2015). Ce processus entraîne l'activation d'ATGL conduisant à l'hydrolyse des TAGs en DAG + acides gras. Une Lipase Hormono-Sensible (HSL) est activée par la phosphorylation de la PKA : la HSL se fixe ensuite sur la gouttelette lipidique, au niveau des PLIN1 phosphorylées, permettant la conversion du DAG en monoacylglycérol (MAG) + acides gras (D'andrea, 2016). L'interaction HSL/PLIN1 est catalysée par la phosphorylation de la PKA sur plusieurs résidus de la PLIN1 : Ser⁸¹, Ser²²² et Ser²⁷⁶. Une monoglycéride lipase (MGL) va ensuite achever la libération du dernier acide gras et du squelette glycérol. Les trois acides gras libérés sont ensuite transférés vers la mitochondrie où ils seront dégradés par la β -oxydation (**Figure 42**).

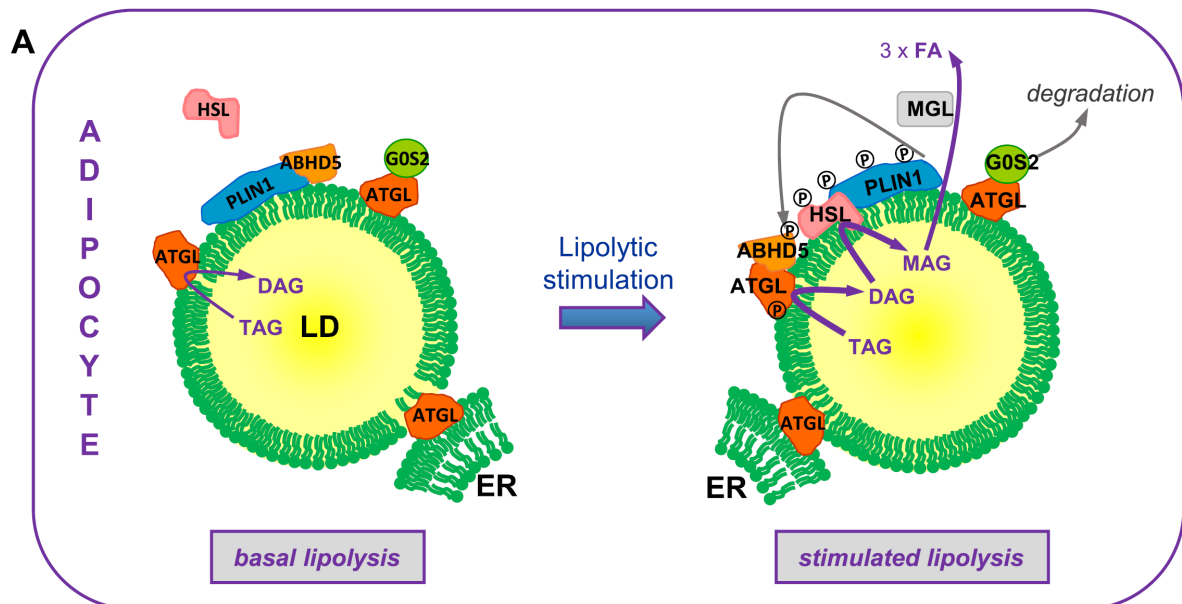


Figure 42 : Mécanisme de lipolyse dans les adipocytes des *Mammalia*. Le mécanisme est décrit dans le corps du texte. ATGL, Adipose Triacylglycerol Lipase ; PLIN1, Périlipine 1 ; HSL, Lipase Hormono-Sensible ; ABHD5 (ou CGI-58), Comparative Gene Identification-58 ; ER, Réticulum endoplasmique ; G0S2, protéine G0/G1 switch protein 2 ; P, phosphorylation (d'après D'Andrea, 2016).

Les gouttelettes lipidiques sont fortement remaniées au cours de la lipolyse suivant un processus qui conduit à diminuer leur taille augmentant le rapport surface/volume

d'accessibilité aux lipases. Les gouttelettes lipidiques passent d'un stade géant (environ 100 μm de diamètre) à de nombreuses micros gouttelettes lipidiques (environ 1 μm de diamètre).

Deux modèles existent concernant la formation de ces microgouttelettes lipidiques :

- 1) Par fragmentation d'une gouttelette lipidique géante (Moore et al., 2005).
- 2) Par capture d'acides gras libérés, potentiellement toxiques pour l'organisme, durant la lipolyse (Paar et al., 2012).

La Fat-Specific-Protein of 27 kDa (FSP27 connue également sous le nom de CIDEA) se lie à ATGL à la surface des gouttelettes lipidiques inhibant le mécanisme de lipolyse en bloquant l'accès de CGI-58 à ATGL. Une réduction de l'expression de FSP27 par des siRNA chez une lignée de souris 3T3-L1 provoque la formation de multiples petites gouttelettes lipidiques ainsi qu'une augmentation de l'activité lipolytique (Nishino et al., 2008). Les protéines FSP27 sont impliquées dans les mécanismes de transfert de lipides entre gouttelettes lipidiques favorisant les mécanismes de fusion, croissance et élargissement (Gong et al., 2011, Jambunathan et al., 2011). FSP27 est notamment en interaction directe avec PLIN1a dans les tissus adipeux blancs favorisant la formation de gouttelettes lipidiques (Grahn et al., 2013, Sun et al., 2013). La taille des gouttelettes lipidiques semble donc régulée également par un équilibre entre PLIN1a et FSP27.

3.3.2.2. Rôle spécifique de la machinerie ERAD

La machinerie ERAD participe également à la régulation des TAG chez les mammifères (**Figure 43**). UBXD8 (UBX domain-containing protein 8) est un inhibiteur de la synthèse des TAG lorsque la synthèse des acides gras est peu importante. Une augmentation de la synthèse des acides gras provoque un acheminement d'une partie de UBXD8 du réticulum endoplasmique vers la gouttelette lipidique où elle recrute VCP (Valosin-containing protein) à la surface de la gouttelette (Suzuki et al., 2012, Olzmann et al., 2013b). Ce mécanisme fait écho au recrutement de CDC48 (autre nom de VCP) par PUX10 au niveau de la gouttelette lipidique du tube pollinique de *Nicotiana tabacum* (Kretzschmar et al., 2018). UBXD8 inhibe ATGL à la surface de la gouttelette lipidique en stimulant la dissociation de ATGL de son cofacteur CGI-58 (Olzmann et al., 2013b).

Un second contrôle est opéré au niveau de DGAT2. Dans un premier temps, il a été montré que l'emploi de PS-341, un inhibiteur du protéasome, réduisait l'expression de DGAT2 (Oliva et al., 2012). Dans un second temps, il a été démontré que DGAT2 était une protéine relativement instable et qui était dégradée par le protéasome 26S après ubiquitination (Choi et al., 2014). Gp78 (Glycoprotein 78) est une E3 ligase impliquée dans le mécanisme ERAD (Chen et al., 2012). Une analyse fonctionnelle de cette protéine par siRNA a montré une

réduction de l'ubiquitination de la DGAT2 et une augmentation de sa stabilisation (Choi et al., 2014). Le transfert de la DGAT2 polyubiquitiné vers le protéasome est réalisé par VCP. Le rôle de UBXD8 au niveau de la dégradation de DGAT2 n'est actuellement pas connu (Stevenson et al., 2016).

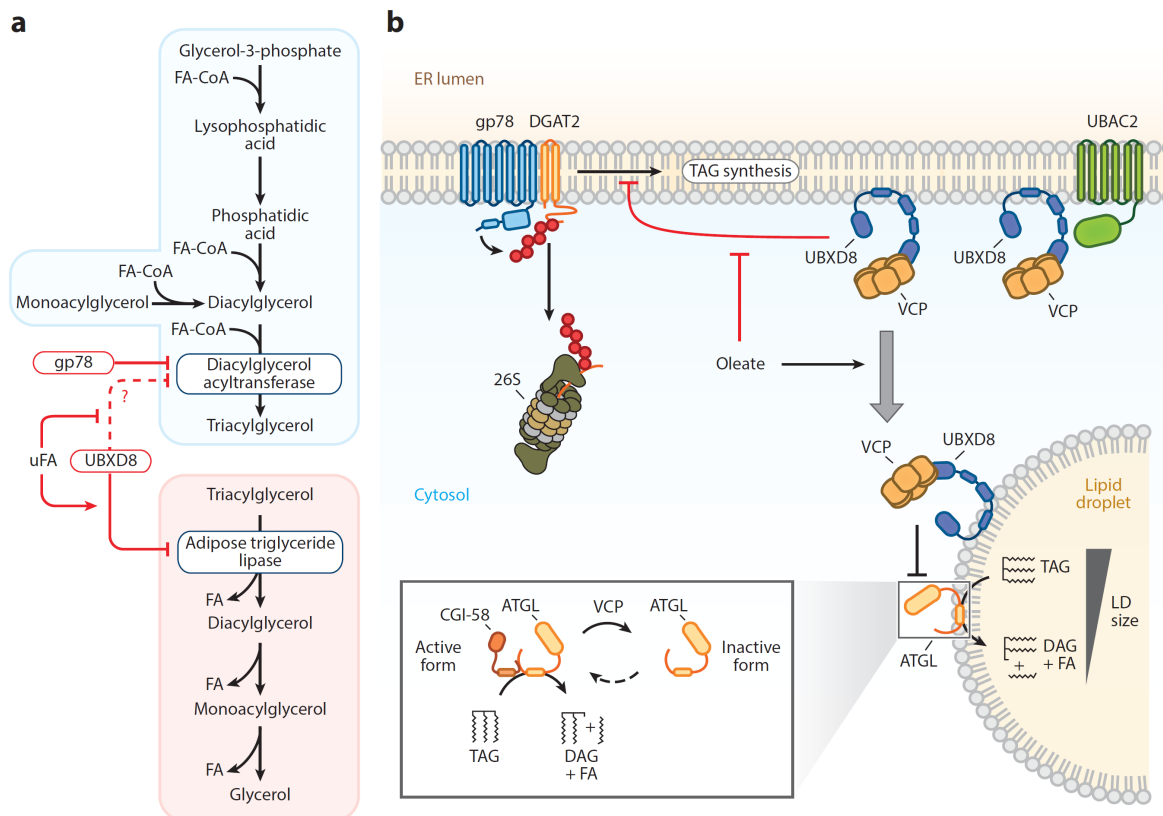


Figure 43 : Régulation du métabolisme des TAG par la machinerie ERAD. a : Représentation schématique des voies de synthèse et de dégradation des TAG. b : Dégradation constitutive de DGAT2 médiée par gp78. ATGL, adipose triglycérine lipase ; DAG, diacylglycérol ; DGAT, diacylglycérol acyltransférase ; ERAD, Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation ; FA, acide gras ; uFA, acide gras insaturé ; FA-CoA, acide gras-Coenzyme A ; gp78, glycoprotéine 78 ; LD, gouttelette lipidique ; TAG, triacylglycérol ; UBAC2, UBA domain-containing protein 2 ; UBXD8, UBX domain-containing protein 8 ; VCP, Valosin-containing protein. (D'après Stevenson et al., 2016).

3.3.2.3. La lipophagie

La lipophagie (**Figure 44**) est une voie alternative de dégradation des gouttelettes lipidiques par autophagie. Une déficience de ce mécanisme est notamment impliquée dans plusieurs pathologies humaines comme l'obésité ou l'athérosclérose (Dong & Czaja, 2011, Liu & Czaja, 2013). Un autophagosome se forme dans le cytoplasme et encapsule la gouttelette lipidique par un mécanisme de type « *Kiss and Run* ». Le mécanisme de fusion « *kiss and run* » correspond à une fusion incomplète (Jahreiss et al., 2008). Cet autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome contenant des enzymes (protéases, lipases) formant un autolysosome. À l'intérieur de cet autolysosome, les enzymes hydrolysent les TAGs et un

équipement spécifique composé de plusieurs protéines conduit à la désorganisation et à la dégradation de la gouttelette lipidique (Thiam et al., 2013a).

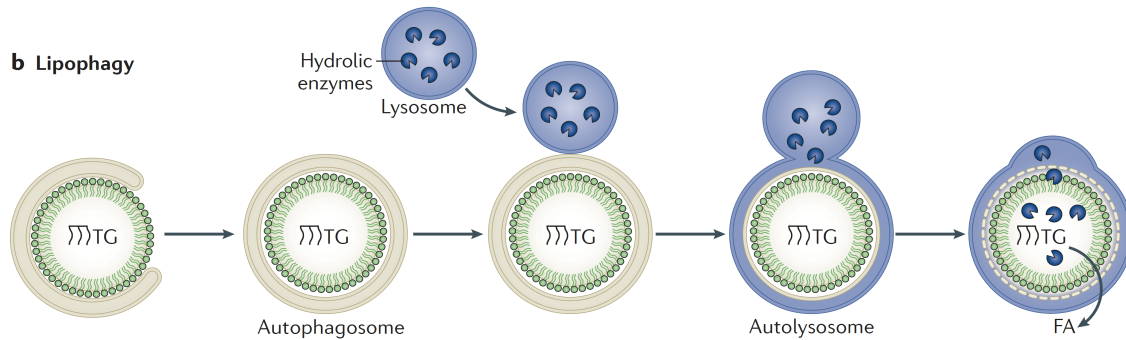


Figure 44 : Mécanisme de lipophagie. FA : Acides gras, TG : Triacylglycérol (D'après Thiam et al., 2013a).

Les protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) constituent une famille de protéines transmembranaires fréquemment rencontrées dans les mécanismes de fusion vésiculaire (transport vésiculaire COP1 et autophagie). Plus de 60 SNAREs ont été identifiées chez les mammifères et la levure (Sørensen et al., 2018). On distingue deux types de SNAREs :

- R-SNARE (anciennement v-SNARE, v pour vésiculaire). R correspond à l'addition d'une arginine pendant le mécanisme de fusion.
- Q-SNARE (anciennement t-SNARE, t pour target). Q correspond à l'addition d'une glutamine pendant le mécanisme de fusion.

La fusion entre deux membranes est favorisée par la formation d'une épingle à 4 hélices composée d'une protéine R-SNARE et de trois protéines Q-SNARE (Martens & McMahon, 2008).

3.3.3. Chez les organismes photosynthétiques

3.3.3.1. Les Viridiplantae

3.3.3.1.1. La lipolyse des graines oléagineuses

La germination des graines oléagineuses entraîne un mécanisme de lipolyse des gouttelettes lipidiques de réserve. Chez *A. thaliana*, les oléosines à la surface de la gouttelette lipidique (OLE1 et OLE2) sont ubiquitinées par l'attachement de trois motifs distincts : une monoubiquitine (Ub) ou une K48-linked diubiquitine (K48Ub₂) ou une K63-linked diubiquitine (K63Ub₂) (Deruyffelaere et al., 2015) (**Figure 45**). L'étiquetage d'une oléosine par une K48Ub₂ provoque son adressage vers le protéasome 26S. L'addition de MG132, un inhibiteur du protéasome 26S, provoque un délai de mobilisation des lipides confirmant que la dégradation des oléosines est prérequis à la mobilisation des lipides (Deruyffelaere et al., 2015). Le mécanisme d'extraction des oléosines en dehors des

gouttelettes lipidiques est aujourd'hui inconnu. Un mécanisme similaire a été découvert dans le protéome de la gouttelette lipidique du tube pollinique de *Nicotiana tabacum* (Kretzschmar et al., 2018). Le domaine UBA de la protéine PUX10 reconnaît la protéine ubiquitinée par un marquage K48 (Cf **Partie 2**).

La lipolyse fait ensuite intervenir trois acteurs : 1) une lipase de type SDP1, 2) un homologue de la protéine des mammifères CGI-58 et 3) un transporteur peroxisomal PXA1. Ces trois acteurs sont localisés au niveau du peroxisome en amont de la lipolyse.

1) La lipase Sugar Dependent 1 (SDP1) et son homologue SDP1-like (SDP1-L) ont été découvertes dans la graine d'*Arabidopsis thaliana* (Eastmond, 2006, Kelly et al., 2011). Cette enzyme est capable d'hydrolyser les TAG, DAG et MAG. SDP1 est une lipase papatin-like (motif GX SXG), c'est-à-dire une sérine estérase avec une diade catalytique Sérine – Acide Aspartique (Rydel et al., 2003). La SDP1 est homologue de la protéine ATGL chez les mammifères, des TAG lipases (TGL3, TGL4, TGL5) de *S.cerevisiae* ou de la protéine BRUMMER de *D. melanogaster* (Quettier & Eastmond, 2009). Un homologue de la SDP1 d'*Arabidopsis thaliana* a été également détecté chez l'algue verte *Lobosphaera incisa* (LiSDP1). Les auteurs montrent par fusion avec la sonde fluorescente m-Venus que cette lipase n'est pas localisée à la surface de la gouttelette lipidique de *L. incisa* (Siegler et al., 2017).

2) Une perte de fonction de la protéine CGI-58 chez *Arabidopsis thaliana* entraîne une accumulation anormale (d'un facteur 10) de gouttelettes lipidiques dans les feuilles (James et al., 2010, Ghosh et al., 2008). De surcroît, les graines des plantes déficientes pour CGI-58 contiennent des quantités équivalentes de lipides neutres indiquant que CGI-58 n'est pas impliquée dans les mécanismes de lipolyse de la graine (James et al., 2010). Contrairement aux mammifères, la protéine CGI-58 n'interagit pas avec la lipase ATGL chez les plantes, mais avec une ATP-binding cassette (ABC) protein (PXA1) (Park et al., 2013). Un orthologue de CGI-58 a été découvert chez la microalgue verte *Chlamydomonas* (Merchant et al., 2007).

3) PXA1 (Peroxisomal ABC-Transporter 1) est localisé au niveau du peroxysome et transporte les acides gras en amont de leur dégradation par la β -oxydation (Zolman et al., 2001, Footitt et al., 2002).

3.3.3.1.2. La lipophagie chez les plantes

L'autophagie chez les plantes peut être induite par différents facteurs (carence nutritionnelle, senescence, pathogènes, dérivés réactifs de l'oxygène, etc.) (Wang et al., 2018). L'autophagie peut être sélective d'un organite ou d'une structure en particulier : chlorophagie pour le chloroplaste (Wada et al., 2009), réticulophagie pour le réticulum (Bernales et al., 2006, Yorimitsu et al., 2006), pexophagie pour le péroxysome (Kim et al., 2013, Shibata et al., 2013, Voitsekhovskaja et al., 2014, Goto-Yamada et al., 2014, Yoshimoto et al., 2014), mitophagie pour la mitochondrie (Ashrafi & Schwarz, 2013, Li et al., 2014), ribophagie pour les ribosomes (Kraft et al., 2008) et protéophagie pour le protéasome 26S (Marshall et al., 2015). L'autophagie peut également jouer un rôle dans la régulation métabolique. Un exemple concerne l'apport en nutriments pour les cellules du tapétum au cours du développement de l'anthere chez le riz, *Oryza sativa*. L'étude du mutant knock-out OsATG7 (autophagy-related 7), bloquant le mécanisme d'autophagie, présente une altération de l'accumulation de lipides dans les grains de pollen conférant une stérilité du sporophyte mâle (Kurusu et al., 2014). La dégradation autophagique dans les cellules du tapétum est essentielle pour le développement de l'anthere post-méiotique chez le riz. Le mutant OsATG7 présente une diminution d'activité de la germination du pollen liée à une diminution de l'accumulation de TAG. Les auteurs suggèrent une altération de l'édition de la PC pendant la maturation du grain de pollen (Cf. **Partie 1**).

3.3.3.2. Les *Heterokonta*

Les connaissances sur le catabolisme des gouttelettes lipidiques chez les diatomées est aujourd'hui très pauvre (Kong et al., 2018). Les microalgues sont soumises à des stress abiotiques importants (température, luminosité, nutriments) les conduisant à remanier la composition de leurs lipides membranaires et/ou à accumuler des gouttelettes lipidiques (Abida et al., 2015, Alboresi et al., 2016). Il semble que la teneur de certains nutriments (azote, N et phosphore, P) soit critique (Nguyen et al., 2011, Simionato et al., 2013, Abida et al., 2015, Popko et al., 2016). Une carence en azote, par exemple, limite la possibilité de synthétiser des acides aminés et des protéines (Longworth et al., 2016). Le surplus induit en carbone peut être pris en charge par l'accumulation de molécules de réserve telles que des TAGs ou des polymères de glucides (Abida et al., 2015). Quand les conditions sont meilleures, les TAG sont hydrolysés et le métabolisme est alimenté en carbone. Sans aller jusqu'à ces conditions de stress, au cours du cycle jour-nuit, les TAG sont synthétisés le jour et dégradés la nuit.

Un homologue de la lipase SDP1 de plantes, TGL1 (Phatrdraft_1971), a été découvert chez *Phaeodactylum* parmi les 49 gènes codants pour des lipases (Barka et al., 2016). Une diminution d'expression de Phatrdraft_1971 provoque une accumulation de TAGs. Un

second acteur du catabolisme des gouttelettes lipidiques a été découvert chez la diatomée *Thalassiosira pseudonana* : CGI-58 (Trentacoste et al., 2013). Cette équipe a recherché les lipases dont l'expression diminuait, dans un microarray, après une carence en silice provoquant l'accumulation de gouttelettes lipidiques. Thaps3_264297 a été identifié comme CGI-58 partageant 29% d'identité avec la protéine de mammifère. Notre équipe a également breveté un homologue de CGI-58 (*PtCGI58* – Phatr3_J54974) chez *Phaeodactylum*. Une diminution d'expression de CGI-58 chez *Phaeodactylum* (lignée antisens) provoque une accumulation de la quantité de TAG (Leterrier et al., 2015).

Une étude récente, basée sur la recherche de domaines conservés et une analyse phylogénétique, a identifiée une TAG lipase putative chez *Phaeodactylum*, appelée OmTGL (Li et al., 2018) (**Figure 47**). Les auteurs montrent, par fusion avec une protéine fluorescente eGFP, que cette lipase est localisée dans la troisième membrane la plus externe du chloroplaste de *Phaeodactylum*.

Au début de ce travail de thèse, les constituants de la gouttelette lipidique de diatomée étaient donc très mal caractérisés. Les fonctions biologiques possiblement associées à la gouttelette lipidique, en dehors d'un rôle de réserve, étaient inconnues et aucun processus régulant la dynamique de cette structure subcellulaire n'était proposé.

Données Bibliographiques – Partie 3

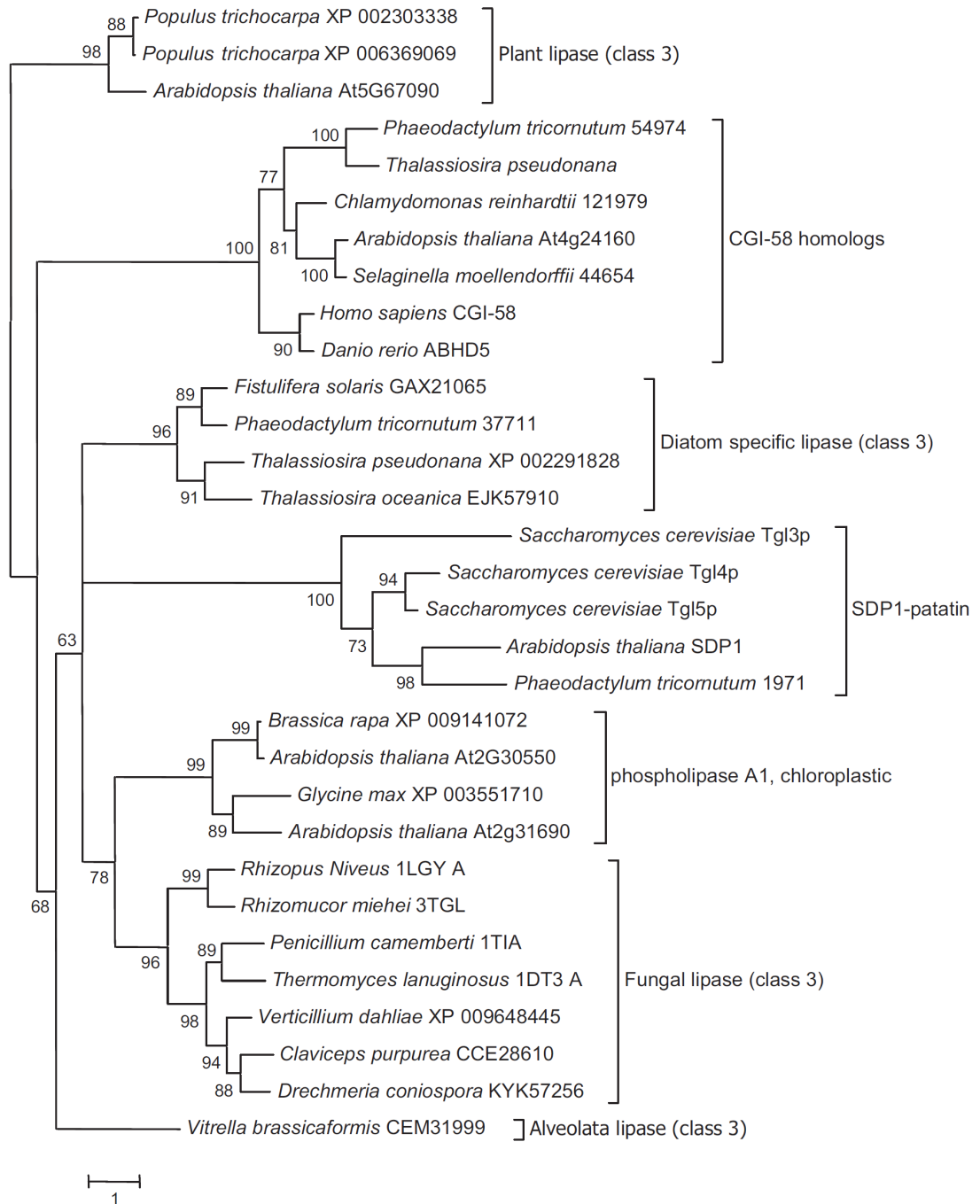


Figure 47 : Relations phylogénétiques entre la majorité des familles de protéines lipases basées sur leurs séquences d'acides aminés. L'arbre phylogénétique a été obtenu selon la méthode de vraisemblance maximale à l'aide du programme MrBayes. Les nombres au-dessus des branches représentent les bootstraps. La barre d'échelle représente les distances d'évolution. (D'après Li et al., 2018).

Partie 4 : Propriétés biophysiques de la gouttelette lipidique

1. Généralités

En faisant abstraction des protéines et des lipides polaires qui structurent sa surface, il est possible de considérer les gouttelettes lipidiques comme le produit d'une émulsion, formée par un mélange simple d'huile dans de l'eau (Thiam et al., 2013b). Le cytosol de la cellule représente la phase aqueuse et la gouttelette d'huile la phase huileuse dispersée. L'interface entre l'huile et l'eau, notée A , crée une tension de surface γ (exprimé en mN m^{-1}) en raison du manque d'interactions cohésives entre les deux phases. Il en résulte un coût énergétique γA pour maintenir la cohésion de la gouttelette lipidique. On parle alors d'émulsions métastables, c'est-à-dire qu'elles sont thermodynamiquement instables, mais dans un état transitoire qui peut durer en l'absence de perturbations extérieures. La présence de tensioactifs permet de réduire la tension superficielle, augmentant ainsi la métastabilité de l'émulsion et réduisant les coûts énergétiques de cohésion de la gouttelette (Georgieva et al., 2009, Kabalnov et al., 1996a, Kabalnov et al., 1996b). La monocouche de lipides polaires en périphérie de la gouttelette lipidique joue ce rôle de tensioactifs. Elle offre une élasticité à l'interface des gouttelettes lipidiques amortissant les fluctuations de tensions.

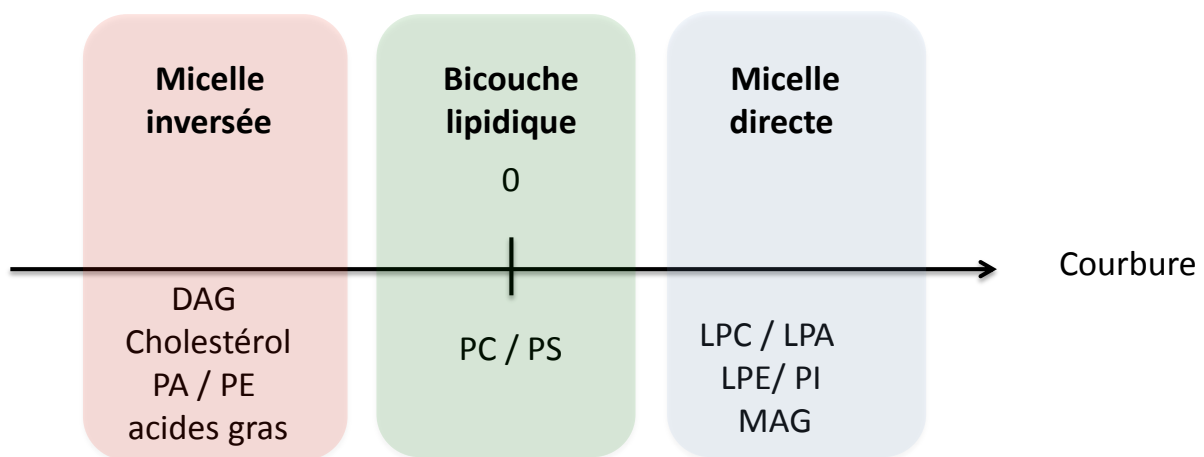


Figure 48 : Propriétés biophysiques des tensioactifs à la surface de la gouttelette lipidique.

Les phospholipides ne sont solubles ni dans la phase aqueuse, ni dans la phase lipidique. Cette propriété permet aux bicouches lipidiques du réticulum endoplasmique de servir de plateforme (hub) de synthèse des phospholipides pour la cellule. Les phospholipides présentent des propriétés de courbure par la différence de zone occupée entre leur tête hydrophile et leur queue hydrophobe (**Figure 48**). Une courbure positive correspond à une tête polaire prédominante formant une micelle directe. C'est notamment le cas des lysophospholipides (LPC, LPA, LPE), du phosphoinositol (PI) et du monoacylglycérol (MAG). A l'inverse, une monocouche formée principalement de DAG, cholestérol, acide

phosphatidique (AP), PE et acides gras formera une micelle inversée. La PC et la PS s'assemblent généralement en structures lamellaires et constitue les principaux composants des bicouches lipidiques (Thiam et al., 2013b). La PC constitue le phospholipide le plus important pour la stabilité des gouttelettes lipidiques.

La tension de surface γ entraîne un effet de compression de la gouttelette lipidique provoquant une augmentation de pression au sein de la gouttelette lipidique (P_{in}). La pression de Laplace (ΔP) correspond à ce contrebalancier de pression entre le milieu intérieur et le milieu extérieur (P_o) (1).

$$\Delta P = P_{in} - P_o = 2\gamma/r \quad (1)$$

Avec ΔP , la pression de Laplace ; P_{in} , la pression à l'intérieur de la gouttelette lipidique ; P_o , la pression du milieu extérieur ; γ , la tension de surface et r , le rayon de la gouttelette lipidique.

Les petites gouttelettes lipidiques présentent une pression de Laplace élevée alors que les plus grosses gouttelettes présentent une pression de Laplace plus faible.

2. Contraintes biophysiques au cours de la biogenèse de la gouttelette lipidique

Comme nous l'avons vu dans la **Partie 3**, le processus de biogenèse de la gouttelette lipidique, décrite essentiellement chez les Mammifères, s'effectue en trois grandes étapes :

- 1) La nucléation correspondant à la formation des molécules de TAGs par la voie de Kennedy au niveau du réticulum endoplasmique résultant en la formation d'une « lentille » à la surface du réticulum.
- 2) La croissance de la gouttelette lipidique par des mécanismes de maturation et de fusion.
- 3) Le bourgeonnement de la gouttelette lipidique par la déformation des monocouches du réticulum endoplasmique.

2.1. La nucléation de la gouttelette lipidique

La première étape de formation d'une gouttelette lipidique consiste en l'apparition d'une lentille au sein du réticulum endoplasmique (**Figure 49**) (Wilfling et al., 2014, Pol et al., 2014).

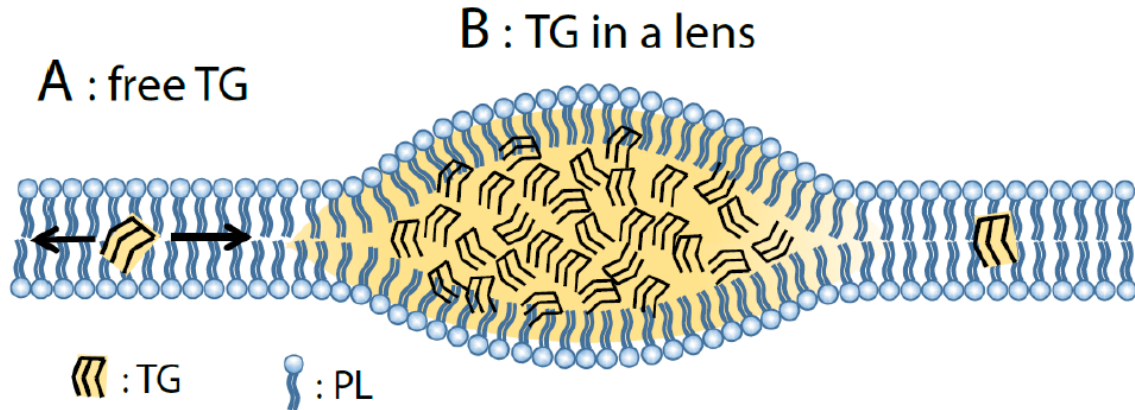


Figure 49 : Nucléation d'une lentille de TAG (TG) au sein de la bicouche lipidique (PL) du réticulum endoplasmique. A : Molécule de TAG libre dans la bicouche lipidique du réticulum. **B :** Accumulation de TAG au sein de la bicouche conduisant à l'apparition d'une lentille de nucléation de TAG (D'après Thiam & Forêt, 2016).

La nucléation des gouttelettes lipidiques dans un mélange fluide subissant une séparation de phase (ou démixtion) constitue un processus stochastique. Un certain nombre de pré-gouttelettes se forment au niveau du réticulum endoplasmique à partir de molécules de TAGs diffusant librement, mais seulement une petite proportion d'entre elles formeront au final une gouttelette lipidique. La durée de vie de ces pré-gouttelettes lipidiques est estimée à quelques millisecondes (Khandelia et al., 2010). Ce phénomène conduit à un optimum énergétique appelé barrière de nucléation (Figure 50).

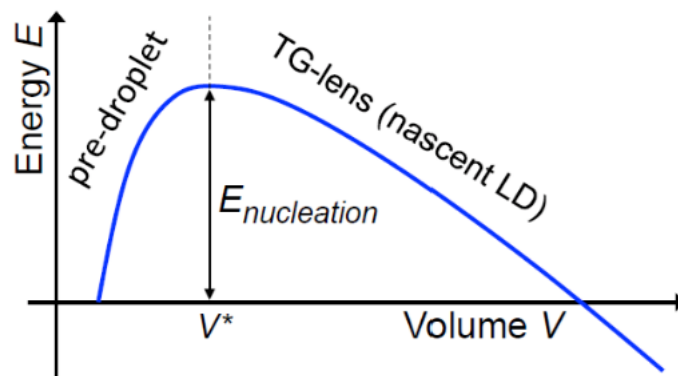


Figure 50 : La barrière énergétique de nucléation (D'après Thiam & Forêt, 2016).

L'énergie, requise pour maintenir stable (cohésive) une gouttelette lipidique, adopte une forme de cloche en fonction du volume des gouttelettes. L'énergie maximum de nucléation $E_{\text{nucléation}}$ est atteinte à un volume V^* de la gouttelette. Lorsque $V < V^*$, des pré-gouttelettes ont tendance à se former alors que lorsque $V > V^*$, ces pré-gouttelettes disparaissent. La démixtion spontanée des molécules de TAG enclenchant la formation des gouttelettes lipidiques a lieu si le gain d'une molécule de TAG libre, $\Delta\mu$ (2), est positif (ce qui signifie que $\epsilon_f > \epsilon_{LD}$) (Thiam & Forêt, 2016).

$$\Delta\mu = \varepsilon_f - \varepsilon_{LD} + kT \ln\phi \quad (2)$$

Avec $\Delta\mu$, le coût énergétique d'avoir une molécule de TAG libre dans la bicouche plutôt que dans une lentille ; ε_f , le coût énergétique de l'interaction d'une molécule de TAG avec d'autres composants du réticulum endoplasmique (phospholipides) ; ε_{LD} : le coût énergétique de l'interaction des molécules de TAG dans la lentille ; kT : l'énergie thermique et ϕ : la concentration de TAG libre dans la bicouche.

$\Delta\mu$ dépend des interactions TAG-TAG et TAG-Phospholipides. La démixtion a lieu si la concentration en TAG est supérieure à la concentration de démixtion critique (ϕ^*) connue également sous le nom de concentration micellaire critique (CMC) dans le cas des micelles. La cloche énergétique de la barrière de nucléation est donnée par l'équation (3) :

$$E(V) = -\Delta\mu \times \rho V + E_s(V) \quad (3)$$

Avec ρ , la densité moléculaire et $E_s(V)$, le coût énergétique lié à l'interface de la gouttelette (dépendant des interactions TAG-Phospholipides)

$\Delta\mu \times \rho V$ favorise la croissance de la gouttelette lipidique lorsque $V > V^*$ alors que E_s s'oppose à la formation des gouttelettes quand $V < V^*$. Le taux de succès de la nucléation dépend de la barrière de nucléation (Safran, 1994, Chandler, 2005, Thiam & Forêt, 2016). Plus la hauteur de la barrière est faible, plus le taux de succès de nucléation des gouttelettes lipidiques est important.

L'homogénéité de la bicouche de phospholipides du réticulum est également un paramètre important à prendre en compte pour le succès de la nucléation. En effet, sur une bicouche uniforme, la nucléation des gouttelettes lipidiques pourrait se faire de façon aléatoire. Cependant, la bicouche de phospholipides du réticulum endoplasmique est hétérogène dans sa composition biochimique. Il existe donc des sites de nucléation spécifiques où l'énergie de nucléation est plus basse. La nucléation peut être favorisée par quatre phénomènes différents :

- 1) la courbure de la membrane développant des défauts hydrophobes favorables à l'accumulation de TAG.
- 2) les sites de synthèse des TAGs défini par la présence des DGATs, ou d'autres enzymes de synthèse telles que les PDATs.
- 3) la présence de protéines (Seipin, FIT, Périlipine, ACSL) induisant la courbure en diminuant l'énergie de flexion de la membrane.
- 4) la présence de protéines et/ou de lipides interagissant avec les TAGs.

2.2. La croissance de la gouttelette lipidique

2.2.1. Mécanisme de coalescence

La coalescence est un mécanisme physique correspondant à la fusion de deux substances identiques (dans notre cas, la fusion de deux gouttelettes lipidiques) (**Figure 51**). Lorsqu'une émulsion d'huile et d'eau est mélangée énergiquement, on observe la fusion des gouttelettes d'huiles entre elles jusqu'à former une gouttelette lipidique géante traduisant la séparation entre l'huile et l'eau. C'est le phénomène de coalescence.

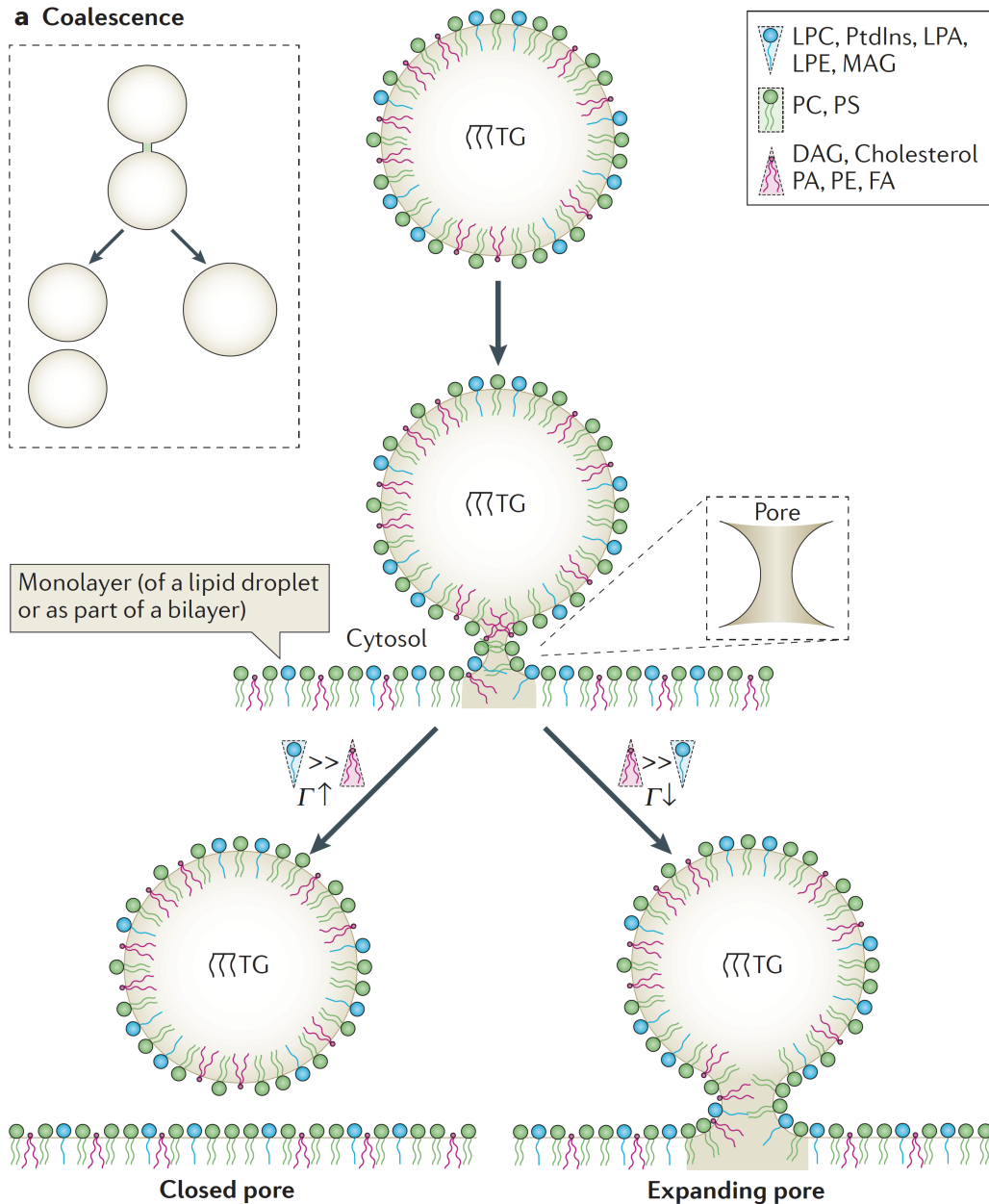


Figure 51 : Mécanisme de coalescence. Une gouttelette contenant du triacylglycérol (TG) et recouverte de phospholipides forme un « pore » avec une autre monocouche de gouttelettes lipidiques ou la monocouche externe d'une bicouche (du réticulum par exemple). Au niveau du pore, la monocouche est courbée. Si la courbure spontanée de la monocouche est positive (par exemple, présence excessive des lipides à courbure positive), la tension de ligne est élevée (Γ) provoquant la fermeture du pore. Si la courbure spontanée de la

monocouche est négative (par exemple, en présence de lipides à courbure négative), la tension de ligne (Γ) est faible. Par conséquent, le pore est stable et peut s'ouvrir davantage. Dans le cas de deux gouttelettes lipidiques, il en résulte une coalescence (ou fusion), générant une plus grosse gouttelette lipidique. Dans le cas d'une gouttelette lipidique et d'une membrane, la fusion entraîne une liaison stable transitoire des gouttelettes lipidiques avec les bicouches. (D'après Thiam et al., 2013b).

Ce phénomène commence par le rapprochement de deux gouttelettes lipidiques par des interactions de Van der Waals, ou des interactions entropiques et électrostatiques. Un pore se forme entre les deux gouttelettes lipidiques lorsque l'épaisseur de la phase aqueuse est de quelques nanomètres. Le pore se forme également lorsque la monocouche de phospholipides est fortement courbée. La fusion est favorisée lorsque la courbure de la monocouche et du pore est à la fois positive et négative. La coalescence dépend de deux propriétés physiques : la tension de surface γ et la tension de ligne Γ (coût énergétique par unité de longueur à la limite des différentes phases. La tension de la ligne est fonction de la longueur de la chaîne acylée et du module de flexion du surfactant) (Thiam et al., 2013b). La fusion se réalise si les fluctuations thermiques surmontent une barrière énergétique proportionnelle à Γ^2 / γ , signifiant une tension de ligne Γ basse et une tension de surface γ élevée (Thiam et al., 2013b). La coalescence est un processus spontané et très rapide s'effectuant en quelques ms (Murphy et al., 2010).

Il a été montré chez la drosophile qu'une déficience en PC ou une délétion de CCT1 (CTP : phosphocholine cytidyltransferase 1) favorisait le mécanisme de coalescence (Guo et al., 2008, Kraemer et al., 2011). CCT1 est une enzyme clé de la synthèse de la PC : elle synthétise la CDP-choline à partir de phosphocholine. La CDP-choline sera assemblée à une molécule de DAG par une aminoalcoholphosphotransférase (AAPT) pour former la PC. De même, la présence de lipides fusogènes, comme l'AP, favoriserait le mécanisme de coalescence (Fei et al., 2011).

2.2.2. Mécanisme de maturation d'Ostwald

Ce mécanisme de destabilisation correspond à la disparition progressive de petites gouttelettes lipidiques d'une émulsion pour laisser la place à des gouttelettes lipidiques plus grandes (**Figure 52**). Ce mécanisme débute par le transfert de molécules de TAGs de petites gouttelettes lipidiques vers de plus grosses. La direction du transfert est dictée par la différence de pression de Laplace (4).

$$2\gamma (1/r_1 - 1/r_2) \quad (4)$$

Avec γ : la tension de surface ; r_1 : le rayon de la gouttelette lipidique 1 et r_2 : le rayon de la gouttelette lipidique 2.

Ce mécanisme est beaucoup plus long que la coalescence et peut prendre plusieurs minutes. La maturation d'Ostwald a notamment été décrite lors de la différenciation adipocytaire faisant intervenir la protéine FSP27 (Gong et al., 2011). FSP27 se localise dans les zones de contact entre deux gouttelettes lipidiques permettant le transfert de TAG d'une gouttelette plus petite vers une plus grande.

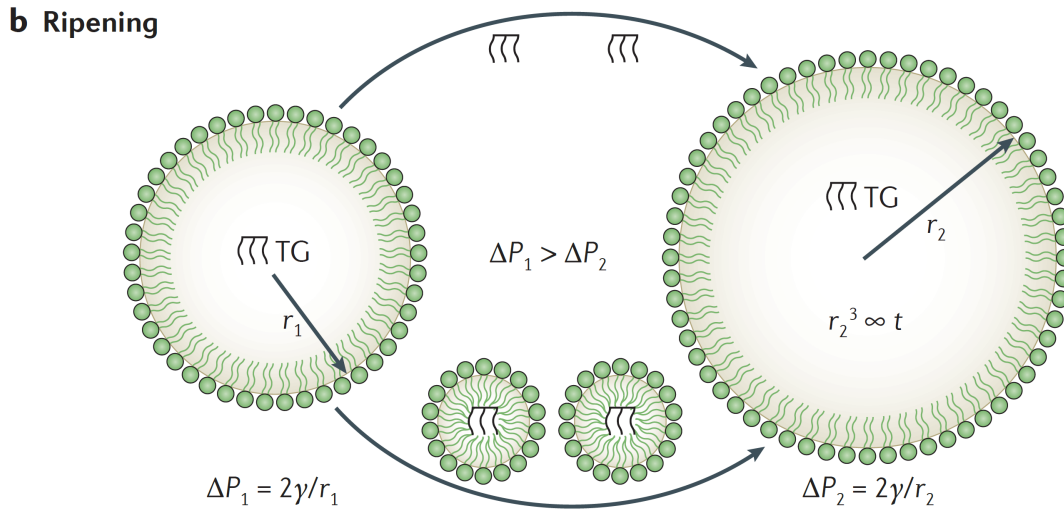


Figure 52 : Principe de la maturation d'Ostwald. Au cours de ce processus, les molécules de triacylglycérol (TG) d'une gouttelette lipidique diffusent à l'autre. La direction est déterminée par la différence des pressions de Laplace entre les deux gouttelettes lipidiques. Les molécules de triacylglycérol passent de la plus petite gouttelette lipidique à la plus grosse. Contrairement à la coalescence, la maturation prend plusieurs minutes. L'augmentation du volume de la plus grosse gouttelette est linéaire dans le temps, $r_2^3 \propto t$. La maturation entraîne la formation de gouttelettes lipidiques de plus petites et de plus grandes tailles. (D'après Thiam et al., 2013b)

2.3. Le bourgeonnement de la gouttelette lipidique

Le bourgeonnement de la gouttelette lipidique correspond à l'initiation de la déformation de la bicouche du réticulum endoplasmique permettant de former une gouttelette subsphérique. Le bourgeonnement de la gouttelette lipidique peut être rapporté à un phénomène de « mouillage » à trois phases (Kusumaatmaja & Lipowsky, 2011). En physique, le mouillage correspond au comportement d'un liquide en contact avec une surface solide. Dans le cas de la gouttelette lipidique, on parle de système à trois phases : la phase cytosol, la phase lumière du réticulum endoplasmique et la phase lipidique (**Figure 53A**). L'équilibre de la gouttelette lipidique entre le cytosol et la lumière du réticulum est défini par la tension superficielle entre les trois interfaces : $\gamma_{\text{cyto-LD}}$, $\gamma_{\text{RE-LD}}$, $\gamma_{\text{RE-cyto}}$. La tension $\gamma_{\text{RE-cyto}}$ est d'environ $10^{-2} \text{ mN m}^{-1}$ (Upadhyaya & Sheetz, 2004) et les tensions $\gamma_{\text{cyto-LD}}$ et $\gamma_{\text{RE-LD}}$ sont évaluées entre $0,1$ et 1 mN m^{-1} (Thiam et al., 2013b, Thiam & Pincet, 2015). A partir de ces trois tensions

superficielles, il est possible de déterminer deux paramètres : le paramètre d'étalement E et le paramètre de bourgeonnement B :

$$E = \gamma_{RE-cyto} - \gamma_{cyto-LD} - \gamma_{RE-LD}$$

$$B = \gamma_{RE-cyto} + \gamma_{cyto-LD} - \gamma_{RE-LD}$$

L'angle de contact α permet de définir plusieurs situations : le mouillage total (l'angle α a une valeur grande car la lentille est aplatie et $E > 0$) (**Figure 53A**), le mouillage partiel (la gouttelette est plus ou moins partiellement formée avec un angle α intermédiaire et $E < 0 < B$) (**Figures 53B et 53C**), et le démouillage complet (la gouttelette est complètement formée avec un angle α proche de 0° et $B < 0$) (**Figure 53D**) (Thiam & Forêt, 2016). Lorsque le mouillage est partiel, l'angle de contact α est défini par (5) :

$$\cos \alpha = (\gamma_{RE-LD}^2 - \gamma_{RE-cyto}^2 - \gamma_{cyto-LD}^2) / 2 \times \gamma_{RE-cyto} \times \gamma_{cyto-LD} \quad (5)$$

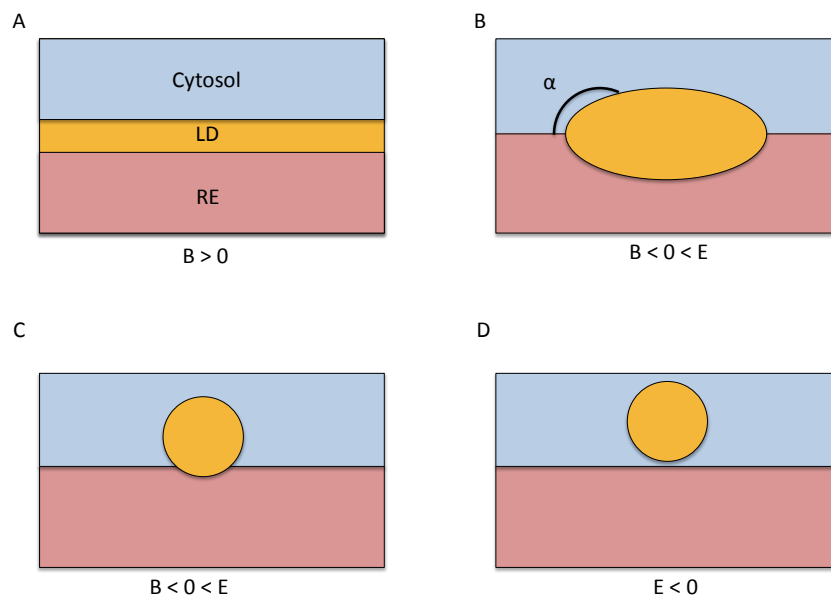


Figure 53 : Représentation schématique du bourgeonnement de la gouttelette selon un modèle de mouillage à trois phases. A, Le système à trois phases : la phase cytosolique, la phase lipidique (LD) et la phase réticulum endoplasmique (RE). Le mouillage est ici total. B et C, le mouillage est partiel. La forme de la gouttelette est déterminée par l'angle α . D, le démouillage est complet formant une gouttelette lipidique détachée du réticulum endoplasmique. (Modifié d'après Thiam & Forêt, 2016).

Lors du bourgeonnement, il existe également une compétition physique entre la tension de surface et la rigidité de flexion membranaire pouvant conduire progressivement à la formation de la gouttelette lipidique (Forêt, 2014).

Un autre aspect important du bourgeonnement est la polarisation des gouttelettes lipidiques vers le cytosol. En effet, cette formation directionnelle des gouttelettes lipidiques est

aujourd'hui mal comprise. Une étude récente montre que des asymétries de tensions entre les monocouches membranaires régulent le côté de bourgeonnement des gouttelettes lipidiques (Chorlay & Thiam, 2018). Cette asymétrie pourrait être provoquée soit par la composition lipidique, soit par des protéines comme FIT2 ou les Seipins (Chen & Goodman, 2017).

Avant ces travaux de thèse, la présence et la localisation subcellulaire d'acteurs moléculaires liés à ces contraintes biophysiques (Exemples : FIT2, Seipins, lipides polaires) n'étaient pas déterminés chez les diatomées.

Objectifs du travail de thèse

Avant mon arrivée au laboratoire, les données relatives à la biogenèse des gouttelettes lipidiques et à leur architecture chez les diatomées étaient très pauvres. On savait que des gouttelettes lipidiques s'accumulaient dans le cytosol en carences nutritives, essentiellement d'azote et de phosphore (Abida et al., 2015) et que quelques acteurs protéiques, tels que CGI-58, étaient impliqués (Trentacoste et al., 2013, Leterrier et al., 2015). Lors de ma première année de thèse, un protéome très sommaire de gouttelette lipidique de *Phaeodactylum* a été publié (Yoneda et al., 2016).

Le premier objectif était d'explorer différentes conditions environnementales provoquant une accumulation de gouttelettes lipidiques chez la diatomée modèle *Phaeodactylum* sans passer par une étape classique de carence nutritionnelle. Mon travail de thèse a commencé par une contribution à un criblage de petites molécules induisant une accumulation de TAGs (Chapitre 1). Les cibles biologiques potentielles des molécules identifiées lors de ce criblage ont permis d'élaborer plusieurs hypothèses de travail, pointant le rôle possible du monoxyde d'azote NO[•] (Chapitre 2) et d'oxylipines non-enzymatiques (Chapitre 3) dans l'induction de TAG chez *Phaeodactylum*.

Le second objectif de cette thèse consistait à réaliser une dissection de l'architecture de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum tricornutum*. Pour cela, nous avons développé, optimisé et mis en œuvre une méthode de purification des gouttelettes lipidiques sur gradient de densité avec chargement en fond de tube. Nous avons ensuite étudié le glycérolipidome, la composition en pigments et stérols et le protéome de gouttelettes lipidiques purifiées (Chapitre 4).

Le troisième objectif était de réaliser une étude fonctionnelle de CGI-58 par une approche anti-sens (Chapitre 5). CGI-58 est une protéine localisée à la surface des gouttelettes lipidiques chez les mammifères (D'Andrea, 2015) et au niveau du peroxysome chez les plantes (Park et al., 2013) et est notamment impliquée dans le mécanisme de lipolyse. Le but était notamment de savoir si CGI-58 pouvait être impliqué dans le mécanisme de remobilisation des acides gras issus des TAGs chez *Phaeodactylum* ?

Un dernier objectif était d'exploiter les données de protéomique pour tenter de modifier la localisation de la gouttelette lipidique en l'ancrant à la membrane plasmique. Pour ce faire, des protéines fusions avec des domaines d'ancrage ont été envisagées. Ces développements font partie des perspectives du travail présenté dans ce mémoire.

Matériel & Méthodes

1. Organismes modèles et méthodes de culture

1.1. La diatomée *Phaeodactylum tricornutum* Pt1

1.1.1. Souche Pt1 8.6

L'intégralité des expérimentations a été réalisée avec la souche *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1896), écotype Pt1 (Souche 8.6. CCAP1055/1 ou CCMP2561) provenant de la collection du NCMA (*National Center for Marine Algae and Microbiota*) aux Etats-Unis.

1.1.2. Méthodes générales de culture et mises en carence nutritionnelles

1.1.2.1. Milieu de culture ESAW

Le milieu de culture ESAW (*Enrichment solution with Artificial Water*) est un milieu synthétique utilisé pour reconstituer l'eau de mer. Ce milieu présente l'avantage d'être modulable, notamment dans la composition des nutriments majeurs, azote et phosphore (NaNO_3 et NaH_2PO_4). Pour l'intégralité de nos expérimentations, nous avons utilisé soit le milieu ESAW 10N10P (c'est-à-dire 5,49 mM de NaNO_3 et 0,224 mM de NaH_2PO_4) ou le milieu ESAW 00N10P (0 mM de NaNO_3 et 0,224 mM de NaH_2PO_4) correspondant à un milieu carencé en azote. La composition du milieu ESAW est donnée dans le **Tableau 8**.

1.1.2.2. Méthodes et conditions de cultures

La diatomée *Phaeodactylum tricornutum* est maintenue en culture dans des incubateurs (Infors HT Minitron Pro) à 20°C, avec une agitation de 100 rpm, une photopériode 12 h jour / 12 h nuit et une intensité lumineuse de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$. En fonction des expérimentations, les cultures de *Phaeodactylum* ont été réalisées dans différents types de supports : plaques 24 puits dans lesquelles sont ajoutées des billes pour favoriser l'agitation, ainsi que des erlenmeyers de 50 mL, 100 mL, 250 mL et 1 L.

1.1.2.3. Cryopréservation des souches d'études

La cryopréservation des souches est réalisée dans des cryotubes 1,5 mL (Greiner Bio-One Ltd, Stonehouse, Royaume-Uni). Environ 10^7 cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 4000 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 850 μL de milieu de culture ESAW 10N10P (**Tableau 8**). Un volume de 150 μL de DMSO 100% (Sigma Aldrich) est ajouté. La cryopréservation s'effectue par paliers successifs : 30 minutes à 4°C, puis 2 heures à -20°C et un stockage à long terme à -80°C.

Matériel & Méthodes

ESAW 10N10P			
Solution Sel 1	Volume final	Concentration Finale	
NaCl	100 mL pour 1 L de milieu final	21,194 g L ⁻¹	362,7 mM
Na ₂ SO ₄		3,550 g L ⁻¹	25 mM
NaHCO ₃		0,599 g L ⁻¹	8,03 mM
KBr		0,174 g L ⁻¹	2,067 mM
H ₃ BO ₃		0,0863 g L ⁻¹	0,725 mM
MgCl ₂		0,0230 g L ⁻¹	0,372 mM
NaF		0,0028 g L ⁻¹	0,0657 mM
Solution Sel 2	Volume final	Concentration Finale	
MgCl ₂ , 6H ₂ O	100 mL pour 1 L de milieu final	9,592 g L ⁻¹	47,18 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O		1,344 g L ⁻¹	9,134 mM
SrCl ₂ , 6H ₂ O		0,0218 g L ⁻¹	0,082 mM
Nutriments majeurs	Volume final	Concentration Finale	
NaNO ₃	10 mL pour 1 L de milieu final	46,67 mg L ⁻¹	5,49 mM
NaH ₂ PO ₄	10 mL pour 1 L de milieu final	3,094 mg L ⁻¹	0,22 mM
Trace Métaux	Volume final	Concentration Finale	
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	1 mL pour 1 L de milieu final	3,09 mg L ⁻¹	14,86 µM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O		73 µg L ⁻¹	0,254 µM
CoCl ₂ , 6H ₂ O		16 µg L ⁻¹	0,0569 µM
MgCl ₂ , 6H ₂ O		540 µg L ⁻¹	2,42 µM
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O		1,48 µg L ⁻¹	0,52 µM
Na ₂ SeO ₃		0,173 µg L ⁻¹	10 nM
NiCl ₂ , 6H ₂ O		1,49 µg L ⁻¹	0,115 nM
CuSO ₄ , 5H ₂ O		9,8 µg L ⁻¹	0,614 nM
Autres	Volume final	Concentration Finale	
Fer-EDTA	1 mL pour 1 L de milieu final	3 mg L ⁻¹	8,17 µM
Vitamines	1 mL pour 1 L de milieu final	1 mg L ⁻¹ vitamine H	4,09 nM
		1 mg L ⁻¹ vitamine B ₁₂	2,94 nM
		0,2 g L ⁻¹ vitamine B ₁	0,594 µM

Tableau 8 : Composition du milieu ESAW 10N10P.

1.1.3. Incubation en présence de composés chimiques

1.1.3.1. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été utilisé pour l'étude du rôle potentiel des oxylipines non-enzymatiques chez *Phaeodactylum* dans des contextes de stress oxydatifs (Résultats - Chapitre 3). Une solution fraîchement préparée de H₂O₂ (Sigma Aldrich, H1009, 30% v/v) est dissoute une première fois dans du milieu ESAW 10N10P (**Tableau 8**) afin d'atteindre une concentration stock de 0,5 M. Un volume de 50 mL de culture de *Phaeodactylum* est incubé à une densité cellulaire de 5.10⁶ cellules mL⁻¹ dans des erlenmeyers de 100 mL avec différentes concentrations de H₂O₂ (0, 0,25 et 0, 75 mM) en triplicat biologique pendant 48 heures, dans un incubateur Infors HT Minitron Pro, à 20°C, présentant une photopériode 12 h jour (40 μmol m⁻² s⁻¹) / 12 h nuit .

1.1.3.2. Isoprostanoïdes

Les isoprostanoïdes correspondent à une classe d'oxylipine dont la structure chimique présente un cycle cyclopentane. Ces composés sont synthétisés par une voie non-enzymatique. Neuf isoprostanoïdes synthétisés par l'équipe de Thierry Durand (Institut des biomolécules Max Mousseron, Montpellier) ont été testés (**Tableau 9**). Chaque concentration stock contenait 1 mg du composé dissous dans 1 mL de méthanol. Un volume de 2 mL de culture de *Phaeodactylum* a été incubé à une concentration de 10⁶ cellules mL⁻¹ dans une plaque 24 puits (Corning Incorporated, New York, USA) avec une gamme de concentration (0, 5, 25 et 50 μM) avec chacun des isoprostanoïdes pendant 48 heures, dans un incubateur Infors HT Minitron Pro, à 20°C, présentant une photopériode 12 h jour (40 μmol m⁻² s⁻¹) / 12 h nuit.

1.1.3.3. 17α-éthynylestradiol

Le 17α-éthynylestradiol (19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol / Sigma Aldrich) est une variante synthétique des hormones naturelles estrone et estradiol (Inhoffen & Hohlweg, 1938). Ce composé est notamment utilisé dans la pillule contraceptive (Jensen & DeSombre, 1973). Ce composé a été identifié lors d'un crible phénotypique réalisé par Mélissa Conte avant mon arrivée au laboratoire (**Résultats – Chapitre 1**). Dans le cadre de cette thèse, le 17α-éthynylestradiol a été utilisé pour l'étude de la réponse transcriptomique induite chez *Phaeodactylum*. Un volume de 50 mL de culture de *Phaeodactylum* a été incubé à 10⁶ cellules mL⁻¹, en triplicat biologique, avec des doses croissantes de 17α-éthynylestradiol (0, 10 et 20 μM) pendant 4 jours dans un incubateur Infors HT Minitron Pro, à 20°C, présentant une photopériode 12 h jour (40 μmol m⁻² s⁻¹) / 12 h nuit, afin d'atteindre une concentration cellulaire minimale de 6.10⁶ cellules mL⁻¹.

1.1.3.4. Epibrassinolide

L'épibrassinolide (22R,23R,24R-2 α ,3 α ,22,23-Tetrahydroxy-B-homo-7-oxa-5 α -ergostan-6-one / Sigma Aldrich) est un brassinostéroïde, une classe de phytohormone impliquée dans de nombreux mécanismes chez les plantes supérieures, comme l'élongation cellulaire ou la formation du tube pollinique. Ce composé a été identifié lors d'un crible phénotypique réalisé par Mélissa Conte avant mon arrivée au laboratoire (**Résultats – Chapitre 1**). L'épibrassinolide a été utilisé dans le cadre d'une étude lipidomique et transcriptomique chez *Phaeodactylum*. Un volume de 50 mL de culture de *Phaeodactylum* a été incubé, en triplicat biologique, à une concentration initiale de $2 \cdot 10^6$ cellules mL⁻¹ avec des doses croissantes (0,10 et 30 μ M) d'épibrassinolide pendant 4 jours afin d'atteindre une concentration cellulaire minimale de $6 \cdot 10^6$ cellules mL⁻¹ nécessaire pour les analyses transcriptomique et lipidomique.

1.1.3.5. *trans,trans*-2,4-decadienal (DD)

Le *trans,trans*-2,4-decadienal (DD, Acros Organics, Geel, Belgique) est un aldéhyde volatil. Une solution stock de DD est fraîchement préparée pour chaque expérimentation soit dans du méthanol (concentration finale 0,5%), soit dans du milieu de culture ESAW 10N10P. Un volume de 1 mL de culture de *Phaeodactylum* à $1,2 \cdot 10^6$ cellules mL⁻¹ a été incubé avec différentes concentrations de DD dans une plaque 24 puits pendant 3 heures, dans un incubateur Infors HT Minitron Pro, à 20°C, présentant une photopériode 12 h jour (40 μ mol m⁻² s⁻¹) / 12 h nuit. Le contrôle a été incubé en présence du vecteur de solubilisation (0,5% méthanol) dans les mêmes conditions expérimentales.

1.1.3.6. Z-VAD-FMK

Le Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-méthyl]-fluorométhylketone) (Promega, Madison, USA) se lie de façon irréversible au site catalytique des protéases caspases et peut inhiber l'induction de l'apoptose. Cet inhibiteur a été utilisé à une concentration de 20 μ M, comme suggéré par le fournisseur, et ajouté en même temps que le DD dans le milieu de culture ESAW 10N10P (**Tableau 8**).

Matériel & Méthodes

Phytostanes (PhytoPs)	
9-L ₁ -PhytoP	
<i>ent</i> -9-L ₁ -PhytoP	
16-B ₁ -PhytoP	
<i>ent</i> -16-B ₁ -PhytoP	
Isoprostanes (IsoPs)	
8-F _{3t} -IsoP	
8- <i>epi</i> -8-F _{3t} -IsoP	
18-F _{3t} -IsoP	
18- <i>epi</i> -18-F _{3t} -IsoP	
Neuroprostane (NeuroP)	
4(RS)-4-F _{4t} -NeuroP	

Tableau 9 : Isoprostanoïdes testés pour leurs effets possibles sur le phénotype de *Phaeodactylum* (Résultats - Chapitre 3).

1.2. *Escherichia coli* DH5 α

Les bactéries *Escherichia coli* (souche DH5 α , Fisher Scientific) sont cultivées en milieu *Lysogeny Broth* (LB) liquide ou gélosée (15%, m/v) à 37°C. Les bactéries *Escherichia coli* DH5 α utilisées présentent le génotype suivant: F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻,m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ ⁻. Les mutations *recA1* (mutation ponctuelle remplaçant la glycine par l'acide aspartique en position 160 inactivant la recombinaison homologue) et *endA1* (inactivant une endonucléase intracellulaire empêchant la dégradation du futur plasmide inséré) augmentent la stabilité des inserts d'ADN et améliorent la qualité de l'ADN plasmidique préparé à partir de minipreps. La mutation *lacZ*M15 permet la détection de bactéries recombinantes lors de clonages moléculaires grâce à la propriété d' α -complémentation de la β -galactosidase (Ullmann et al., 1967). Les bactéries *E. coli* sont cultivées en présence de X-gal : les bactéries transformées avec de l'ADN recombinant produiront des colonies blanches alors que les bactéries transformées avec des plasmides non recombinants développeront des colonies bleues.

2. Méthodes de biologie moléculaire

2.1. Plasmides utilisés

2.1.1. Le plasmide PH4-AS_MCS-II

Le plasmide PH4-AS_MCS-II (**Figure 54**) a été fourni par Angela Falciatore (Laboratoire de Biologie Computationnelle et Quantitative – Université Pierre et Marie Curie – Paris). Ce plasmide permet l'insertion de transgènes chez *Phaeodactylum* (De Riso et al., 2009). Le vecteur présente une résistance à l'ampicilline (Amp^R en vert) permettant une sélection chez les bactéries ainsi qu'une résistance à la zéocine (SHBLE en vert) permettant une sélection chez les microalgues. Le gène inséré est sous le contrôle du promoteur du gène de *Phaeodactylum* codant pour l'Histone 4 (pH4 en jaune) et du terminateur Fucoxanthin A (FcpA en rouge).

Matériel & Méthodes

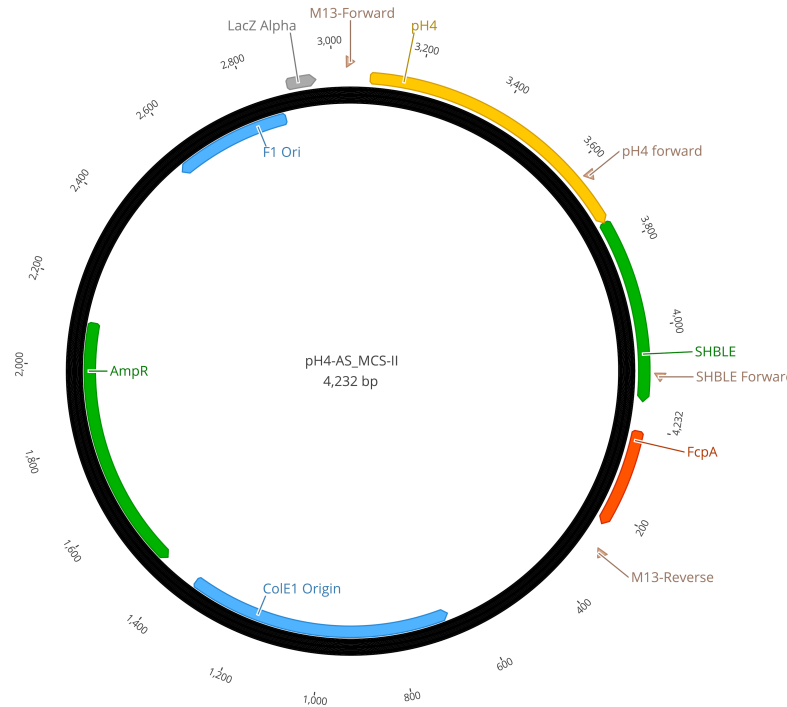


Figure 54 : Carte du vecteur PH4-AS_MCS-II utilisé pour l'expression génique chez *Phaeodactylum*.

2.1.2. Le plasmide PH4-peGFPmono Zeo

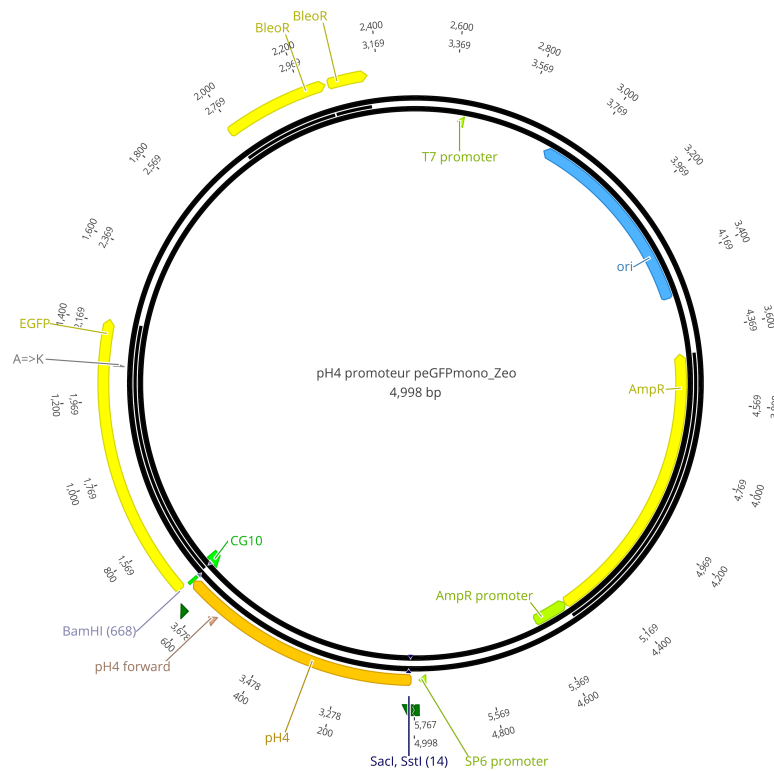


Figure 55 : Carte du plasmide PH4-peGFPmono Zeo utilisé pour la localisation de protéines fluorescentes chez *Phaeodactylum*.

Le plasmide PH4-peGFPmono Zeo (**Figure 55**) a été utilisé pour la construction de protéines fusion avec la GFP (eGFP) dans les études de validation du protéome de la gouttelette

Matériel & Méthodes

lipidique de *Phaeodactylum*. Le vecteur présente une résistance à l'ampicilline (AmpR) dans les bactéries ainsi qu'une résistance à la zéocine (BleoR) permettant une sélection chez les microalgues. Le gène inséré est sous le contrôle du promoteur Histone 4 (pH4) de *Phaeodactylum*.

2.2. Extraction et purification de l'ADN génomique

100 mL de cultures exponentielles de *Phaeodactylum* sont centrifugées 7 minutes à 4000 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot transvasé dans un tube de 1,5 mL est plongé rapidement dans de l'azote et congelé rapidement dans un tube eppendorf 1,5 mL. Le culot est ensuite suspendu dans 150 µL de tampon de lyse (250 mM Tris, pH 8,2, 100 mM EDTA, 2% SDS et 100 mM NaCl). Le culot est broyé avec un piston pendant 1 minute. 150 µL de tampon de lyse est rajouté en lavant le piston. Le mélange de 300 µL est complété avec 300 µL de phenol:chloroforme:isoamyl alcool (25:24:1). Le tube est agité, à l'aide d'un vortex, pendant 10 minutes à 12000 g à 4°C. Une phase aqueuse (en haut du tube) et une phase organique (en bas du tube) séparées d'un disque opaque contenant des protéines dénaturées se forment. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube eppendorf 1,5 mL. Une deuxième extraction est réalisée par l'ajout de 300 µL de phenol:chloroforme:isoamyl alcool (25:24:1). La phase supérieure est transférée dans un nouveau tube. 30 µL d'acétate de sodium (pH 5) sont ajoutés et le tube est agité à l'aide d'un vortex. 800 µL d'éthanol 100% froid est ajouté. L'ADN précipite pendant 30 minutes à 4°C. Le tube est centrifugé pendant 15 minutes à 12000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé. 1 mL d'éthanol 70% est ajouté, le tube est agité à l'aide d'un vortex, puis centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le tube est placé dans un bain sec à 55°C pendant 5 minutes. L'ADN génomique (ADNg) est resuspendu dans de l'eau stérile par incubation des échantillons 10 minutes à 55°C. La concentration et la pureté de l'ADN génomique (ADNg) sont déterminées avec un NanoDrop2000 (ThermoFisher Scientific). L'ADNg est considéré comme pur si le ratio A_{260}/A_{280} est égal à 1,8 et si le ratio A_{260}/A_{230} est compris entre 1,8 et 2,2.

2.3. Méthodes de clonage

2.3.1. Constructions anti-sens

Un ADN antisens correspond à un brin d'ADN synthétique interagissant avec un ARNm et inhibant la synthèse de la protéine correspondante. Dans le cadre de cette thèse, une lignée antisens du gène CGI-58 a été réalisée dans le vecteur plasmide PH4-AS_MCS-II. Le fragment de PCR amplifié à l'aide d'amorces (**Tableau 10**) complétées de sites de restriction et le vecteur PH4-AS_MCS-II sont digérés avec les enzymes EcoRI et XbaI.

		5' -> 3'
CGI-58 - AS	Forward	TCGAATTCTTGCAGGGTCGTCTGATGTA
	Reverse	CTAGATCTAGATGGCCCGACTTACTCACT

Tableau 10 : Primers utilisés pour la construction des lignées anti-sens du gène de CGI-58.

La ligation du plasmide et de l'insert est réalisée avec une T4 ligase pendant une nuit et sur un lit de glace afin de créer un gradient de température croissant.

2.3.2. Clonage Gibson

Le clonage Gibson est une méthode rapide permettant l'assemblage de plusieurs fragments d'ADN dans une seule réaction isotherme (Gibson et al., 2009) (**Figure 56**). Ce type de clonage a été utilisé dans le cadre de l'étude du protéome de gouttelettes lipidiques, pour l'expression de protéines candidates fusion avec la GFP.

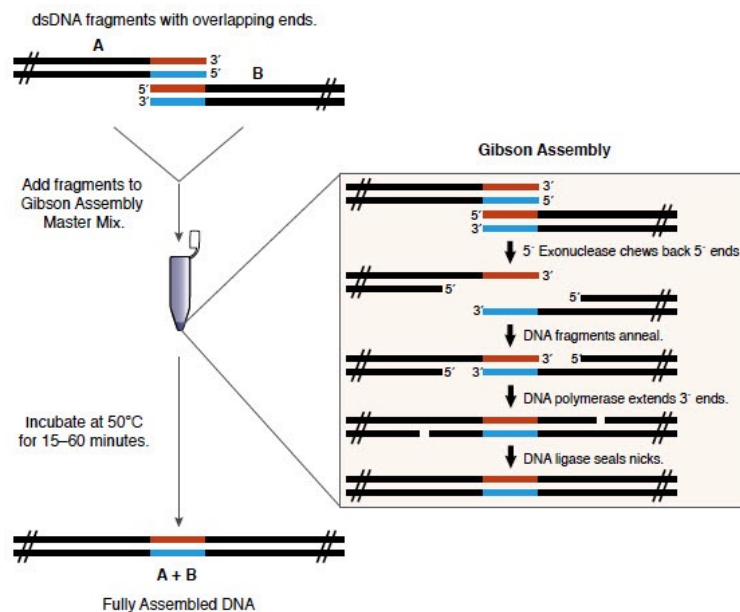


Figure 56 : Principe du clonage Gibson. Le clonage Gibson emploie trois activités enzymatiques: l'exonucléase 5', l'activité d'extension 3' d'une ADN polymérase et l'activité de l'ADN ligase. L'activité exonucléase 5' enlève les séquences d'extrémité 5' et expose la séquence complémentaire pour l'hybridation. L'activité polymérase complète les espaces sur les régions d'annealing. Une ADN ligase scelle ensuite le tout de manière covalente. La réaction s'effectue à 50°C pendant 1 heure. (D'après Gibson et al., 2009).

Pour le clonage Gibson, le vecteur PH4-peGFPmono Zeo (2 µg) est digéré avec BamHI pendant 2 heures à 37°C. Pour éviter que le vecteur ne se referme, 3 µL de phosphatase alcaline intestinale de veau (10000 U mL⁻¹, M02905, New England Biolabs, Ipswich, USA) est ajouté pendant 30 minutes à 37°C. La phosphatase alcaline est inhibée à 65°C pendant 5 minutes. La ligation est ensuite réalisée avec un mélange isotherme dont la composition

Matériel & Méthodes

est donnée dans le **Tableau 11**. Cette ligation est effectuée avec 15 μL de mélange de réaction isotherme et 5 μL de plasmide et d'insert à 50°C pendant 1 heure.

Mélange isotherme 5X	
Tris-HCl 1M pH 7,5	5 mL
MgCl ₂ 1 M	500 μL
dATP 100 mM	100 μL
dCTP 100 mM	100 μL
dGTP 100 mM	100 μL
dTTP 100 mM	100 μL
DTT	500 μL
PEG-8000	2,47 g
NAD	500 μL
Volume final 10 mL, complété avec de l'eau déionisée	

Mélange isotherme	
Mélange isotherme 5x	160 μL
T5 exonucléase	0,2 μL
Phusion High fidelity DNA polymerase	10 μL
Taq DNA ligase	80 μL
Volume final 600 μL , complété avec de l'eau déionisée	

Tableau 11 : Composition du mélange de réaction isotherme utilisé pour le clonage Gibson. dATP, désoxyadénosine triphosphate ; dCTP, désoxycytidine triphosphate ; dGTP, désoxyguanosine triphosphate ; dTTP, désoxythymidine triphosphate ; DTT, Dithiothréitol ; MgCl₂, chlorure de magnésium ; NAD, Nicotinamide Adénine Dinucléotide ; PEG-8000, Polyéthylène glycol.

2.4. Transformation de bactéries avec les produits de ligation et sélection des transformants

- Transformation des bactéries compétentes

Les produits de ligation sont mélangés avec 50 μL de bactéries compétentes et incubés dans la glace pendant 30 minutes. Par choc thermique, le mélange produit de ligation/bactéries est incubé à 42°C pendant 45 secondes puis remis immédiatement dans la

Matériel & Méthodes

glace pendant 3 minutes. Cette étape crée des pores dans les membranes bactériennes visant à faciliter l'entrée du vecteur dans la bactérie. 1 mL de milieu LB stérile sans antibiotique est ajouté. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C et agité à 150 rpm. Le mix est centrifugé 30 secondes à 11000 rpm. Le surnageant est éliminé et les bactéries sont concentrées dans 200 µL de LB. Les bactéries sont étalées stérilement sur une boîte LB agar + carbénicilline. La boîte est maintenue ouverte sous hotte stérile pendant 5 minutes, puis refermée et incubée à 37°C sur la nuit.

- Sélection des transformants par PCR sur colonies

Le lendemain de la transformation, les colonies obtenues sont évaluées par PCR sur colonies afin de détecter la présence du gène d'intérêt. Le kit Phire plant Direct PCR MasterMix est utilisé selon les recommandations du fournisseur (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Le mélange PCR est composé de 10 µL de Master Mix 2X, 10 µL d'eau et 1 µL de chacun des primers (**Tableau 12**). Les colonies sont collectées directement sur la boîte et plongées dans le mix pendant 2 minutes. Le programme PCR suivant est ensuite réalisé:

1. Dénaturation initiale : 98°C – 3 minutes – 1 cycle
2. Amplification : 29 cycles
 - Dénaturation : 98°C – 30 secondes
 - Hybridation : T_m – 30 secondes
 - Élongation : 72°C – 1 minute
3. Elongation finale : 72°C – 5 minutes – 1 cycle
4. 12°C – conservation du produit de PCR

Gibson	Sens 5' -> 3'		Fragment amplifié	T _m (°C)
	Forward	CCGACAATCGTCTTACTCACAGTC	promoteur H4	61.2
	Reverse	CGGGTCTTGTAGTTGCCGTC	GFP	61.0
CGI58-AS	Sens 5' -> 3'		Fragment amplifié	T _m (°C)
	M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG	promoteur H4	51,7
	M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	CGI-58	50,4

Tableau 12 : Liste des primers utilisés pour valider les transformations. La température d'hybridation (T_m) des amorces est indiquée en °C.

Les mélanges obtenus en fin de PCR sont déposés un gel d'agarose 1% (p/v) et mis à migrer pendant 25 minutes à 100V. Une concentration de 50 à 100 ng µL⁻¹ dans 15 µL final est envoyée à la société de séquençage (Eurofins Medigenomix, Ebersberg, Allemagne), permettant de vérifier la qualité de l'amplification et l'absence de mutation dans la séquence.

Matériel & Méthodes

- Extraction de l'ADN plasmidique

Avant de réaliser la transformation des constructions positives, il est nécessaire d'augmenter la quantité d'ADN plasmidique. Ainsi, les colonies déterminées comme positives par PCR et confirmées par séquençage sont mises en culture liquide dans 3 mL de LB contenant de la carbénicilline à 37°C pendant une nuit. L'ADN plasmidique est extrait selon les indications du fournisseur (Macherey Nagel, Hoerd, France) en utilisant le kit Nucleospin Plasmid (Référence 740588.250) et conservé à -20°C jusqu'à la transformation.

2.5. Transformation par biolistique de *Phaeodactylum*

Des cellules de *Phaeodactylum* sont maintenues en phase exponentielle de croissance (entre 1,5 et 2.10⁶ cells mL⁻¹). 10⁸ cellules sont centrifugées à 2250 g pendant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 500 µL de milieu ESAW 10N10P. Un volume de 500 µL de suspension est étalé sur une boîte ESAW 10N10P contenant 1% d'agar (p/v) sans antibiotique. La boîte est maintenue ouverte sous une hotte stérile pendant 30 minutes puis est fermée et transférée dans un incubateur pendant 24 heures à 19°C (20 à 30 µmol m² s⁻¹).

La transformation par biolistique nécessite la préparation préalable de billes de tungstène M17 (BioRad, Hercules, USA). Une suspension de 30 mg de billes de tungstène est agitée dans un tube eppendorf contenant 1 mL d'éthanol 70% (v/v) pendant 5 minutes. Les billes décantent ensuite pendant 15 minutes puis sont récoltées par centrifugation pendant 5 secondes à 6000 g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les billes sont lavées à 3 reprises avec 1 mL d'eau par agitation (1 minute), décantation (1 minute) et centrifugation (10 secondes, 3000 rpm, température ambiante). Les billes sont resuspendues dans 500 µL de glycérol 50% (v/v). Des aliquots de 50 µL sont préparés et stockés à -80°C.

Il est ensuite nécessaire de lier les billes de tungstène avec le plasmide contenant l'insert. Pour cela, 50 µL de billes de tungstène sont mélangées à l'aide d'un vortex avec 3 µg de plasmide contenant l'insert. 50 µL de CaCl₂ (2,5 M) et 20 µL de spermidine (0,1 M) (Sigma) sont ensuite ajoutés. L'ensemble est agité à l'aide d'un vortex pendant 3 minutes. Les billes sédimentent ensuite pendant 1 minute. Les billes sont collectées par centrifugation pendant 10 secondes à 6000 g à température ambiante. Le surnageant est éliminé. On ajoute ensuite 140 µL d'éthanol 70% froid (v/v, conservé à -20°C) pour laver les billes sans agitation. L'éthanol est éliminé, puis les billes sont à nouveau lavées avec 140 µL d'éthanol 100% froid (conservé à -20°C). L'éthanol est éliminé et les billes couvertes d'ADN sont resuspendues dans 48 µL d'éthanol 100%.

Matériel & Méthodes

La transformation des cellules de *Phaeodactylum* est réalisée à l'aide d'un canon à particules PDS-1000/He (Biorad) sous une hotte stérile selon les recommandations du fabricant. La hotte et l'ensemble du matériel nécessaire (Macrocarriers, crans d'arrêt) à la transformation, à l'exception des disques de rupture de 1550 psi, sont nettoyés avec de l'éthanol 70% (v/v) entre chaque tir. Les billes liées au plasmide sont resuspendues doucement. Un volume de 10 μL de la préparation est chargé sur un macroporteur (disque plastique). L'ensemble est maintenu sous hotte quelques minutes afin d'éliminer l'éthanol par évaporation. Une boîte de pétri étalée la veille contenant les cellules de *P. tricornutum* est installée à l'étage 2 du canon à particules après l'installation de disques de rupture. Le bombardement est réalisé à 1550 psi. Cette étape est répétée 4 fois au total sur chaque boîte. La boîte de pétri est fermée, scellée de parafilm et placée dans un incubateur pendant 48 heures (19°C, lumière continue, 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). 1 mL d'ESAW 10N10P est étalé sur la boîte afin de récupérer les cellules. Les cellules sont transférées sur une boîte ESAW agar 10N10P contenant de la zéocine (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) afin de sélectionner les transformants. Cette boîte est placée dans l'incubateur pendant 3 semaines (19°C, lumière continue, 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Les colonies résistantes à l'antibiotique sont réétalées sur boîte ESAW agar 10N10P + zéocine 2 à 3 fois avant d'être inoculées en milieu liquide 10N10P + zéocine pour analyse.

2.6. Mesure de l'expression génique

2.6.1. Extraction et purification des ARN totaux

Les extractions d'ARN sont réalisées à partir de cultures de *Phaeodactylum tricornutum* cultivées dans des erlenmeyers de 250 mL. Environ $5 \cdot 10^7$ cellules sont récoltées après centrifugation à 4000 rpm pendant 7 minutes. Les culots sont cryopréservés dans l'azote liquide et congelés à -80°C. Les culots congelés de *Phaeodactylum* sont repris dans 1 mL de Trizol (Sigma Aldrich) puis agités à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes. Les échantillons sont ensuite incubés sur un thermobloc à 1400 rpm pendant 5 minutes, puis agités pendant 30 secondes. Cette étape est répétée jusqu'à atteindre 15 minutes d'incubation au total. Les tubes sont centrifugés à 11000 g pendant 5 minutes à température ambiante afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube eppendorf de 2 mL. 200 μL de chloroforme sont ajoutés par échantillon, suivi d'une agitation douce par retournement pendant 15 secondes. Les échantillons sont laissés au repos 15 minutes à température ambiante. Les tubes sont centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Un biphasé se forme avec une phase phénol-chloroforme rouge inférieure et une phase aqueuse supérieure. La phase supérieure est collectée et transférée dans un nouveau tube eppendorf de 2 mL. Un volume égal d'isopropanol est ajouté et mélangé doucement par inversion. Les tubes sont incubés 10 minutes à température ambiante. Ils sont de nouveau centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C permettant la formation d'un culot de sels

Matériel & Méthodes

d'ARN. Le surnageant est éliminé et 1 mL d'éthanol / eau DEPC (pyrocarbonate d'éthyle) (75:25, v/v) est ajouté pour nettoyer le culot obtenu. Les tubes sont centrifugés à 7500 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots sont séchés sous hotte pendant 20 à 30 minutes. Ils sont ensuite resuspendus dans 20 à 30 µL d'eau DEPC pendant 5 à 10 minutes à 55°C afin de faciliter l'élution. La quantité et la pureté de l'ARN sont évaluées avec un NanoDrop2000 (ThermoFisher). Un ARN est considéré comme pur si le ratio A_{260}/A_{280} est égal à 2 et si le ratio A_{260}/A_{230} est compris entre 1,8 et 2,2. L'intégrité des ARN est évaluée grâce à la migration des ARN dans un gel d'agarose 2% pendant 45 minutes à 100 V.

2.6.2. Transcription Inverse

La transcription inverse a été réalisée à l'aide du QuantiTect® Reverse transcription kit (Qiagen). La première étape consiste à éliminer l'ADN génomique des ARN en utilisant la gDNAase wipeout. 1 µL de gDNAase wipeout est ajouté à 500 ng d'ARN (dans un volume final de 6 µL). Le mix est incubé 2 minutes à 42°C puis directement replacé dans la glace. La deuxième étape correspond à la réaction de reverse transcription des ARN en ADNc. Le mélange est complété avec 500 µL de reverse transcription Primer Mix, 500 µL de Quantiscript Reverse Transcriptase® et 2 mL de tampon 5X Quantiscript RT buffer. Le mélange obtenu est incubé 30 minutes à 42°C puis 3 minutes à 95°C afin d'inactiver l'enzyme. Les ADNc sont dilués à une concentration de 10 ng µL⁻¹ et stockés à -20°C.

2.6.3. PCR quantitative

La détermination de l'expression génique a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur CFX96™ (BioRad, Hercules, USA). Une gamme de dilution d'ADNc est réalisée en amont de l'expérience pour déterminer l'efficacité des primers des gènes de ménage et de CGI-58 (**Tableau 13**). Les gènes de ménages ont été sélectionnés parmi la liste publiée précédemment (Siaut et al., 2007). L'efficacité d'amplification des primers doit être comprise entre 0,8 et 1,2 pour être utilisable. Le coefficient R^2 de régression linéaire doit être compris entre 0,9 et 1. Le mélange qPCR (10 µL) comprend 2 µL d'ADNc (20 ng), 5 µL de SYBR green SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad, Hercules, USA), 1,8 µL d'eau et 1,2 µL du mélange de primers Forward et Reverse (10 µM).

Matériel & Méthodes

		5' -> 3'
CGI-58	Forward	TATTTGCACCGCTTCTTTTCGTTTG
	Reverse	TATTGAACAGAGGTGTGGGGGATG
H4	Forward	AGGTCCTTCGCGACAATATC
	Reverse	ACGGAATCACGAATGACGTT
HPRT	Forward	AGCTTGGAAGTGTGTACTCTC
	Reverse	TGAAGGTTACTCCTGTCTGAAG
RPS	Forward	AATTCCTCGAAGTCAACCAGG
	Reverse	GTGCAAGAGACCGGACATAC

Tableau 13 : Liste des primers de qPCR utilisés.

Pour chaque duplicat biologique, des triplicats techniques ont été réalisés. Les analyses ont été effectuées avec une plaque 96 puits scellés avec du ruban adhésif (BioRad, Hercules, USA). Le programme qPCR était le suivant :

1. Dénaturation initiale : 95°C – 3 minutes – 1 cycle
2. Amplification – 39 cycles
 - Dénaturation : 95°C – 10 secondes
 - Hybridation : 55°C – 10 secondes
 - Elongation : 72°C – 30 secondes
3. 95°C – 10 secondes
4. Courbe de fusion de l'ADN : 65°C à 95°C - +0,5°C / 5 secondes

L'analyse de l'expression génique a été réalisée à l'aide de la méthode $\Delta\Delta Cq$ proposé par le logiciel CFX manager™ (BioRad, Hercules, USA).

3. Analyses physiologiques

3.1. Concentration cellulaire

Notre équipe a mis au point une méthode de dénombrement cellulaire corrélant l'absorbance à 730 nm en fonction de la concentration cellulaire (Conte et al., 2018) [Résultats – Chapitre 1]. Un volume de 300 μ L de culture est *Phaeodactylum* est transféré dans une plaque 96 puits à fond transparent (Thermo Fisher Scientific, Référence 142010). La concentration cellulaire est déterminée à l'aide d'un Tecan® MInfinite 1000pro en appliquant la régression linéaire suivante :

$$y = 1.834 \cdot 10^{-8} x + 0.03758$$

où x = la concentration cellulaire et y = l'absorbance à 730 nm.

3.2. Chlorophylle

- Fluorescence relative de la chlorophylle

La mesure de fluorescence relative de la chlorophylle est une méthode empirique permettant une estimation rapide et sommaire de la fonctionnalité de la photosynthèse. Un volume de 160 µL de culture de *Phaeodactylum* est transféré dans une plaque 96 puits à fond noir (Greiner, 655086). La fluorescence relative est déterminée grâce à un Tecan® MInfinite 1000pro via une longueur d'onde d'excitation de 440 nm et une longueur d'onde d'émission de 680 nm.

- Dosage de la chlorophylle a par spectrophotométrie

Un volume de 700 µL de culture *Phaeodactylum* est centrifugé pendant 3 minutes à 13000 g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1 mL de méthanol pur. Les échantillons sont à nouveau centrifugés pendant 3 minutes à 13000 g à température ambiante. Le surnageant est utilisé pour mesurer l'absorbance à 652 nm (A_{652}), 665 nm (A_{665}) et 750 nm (A_{750}) en utilisant un spectrophotomètre Jasco V-650. Le niveau de chlorophylle a (Chl a) est déterminé à l'aide de l'équation suivante (Porra et al., 1989) :

$$\text{Chl a} = 16,29 (A_{665} - A_{750}) - 8,54 (A_{652} - A_{750}).$$

3.3. Mesure de la capacité photosynthétique

La spectroscopie d'émission repose sur la désintégration spontanée de molécules qui ont été excitées à un état d'énergie supérieur, par une longueur d'onde donnée et pour laquelle elles émettent un rayonnement. A température ambiante, la plus grande partie de la fluorescence de la chlorophylle provient du photosystème II (PSII). L'efficacité de conversion énergétique maximale du PSII (F_v/F_m), la proportion d'énergie utilisée pour la photochimie ($Y(II)$) et le *non-photochemical quenching* (NPQ) peuvent être mesurés (Misra et al., 2012) en utilisant un système d'imagerie par fluorescence Speedzen MX (JBeamBio) avec des paramètres décrits précédemment (Allorent et al., 2013). La cinétique de la chlorophylle est mesurée dans des volumes de 140 µL de culture de microalgues dans une plaque 96 puits à fond blanc (Greiner, 655075) après 15 minutes d'incubation à l'obscurité. L'excitation est effectuée dans une gamme de bleu ($\lambda = 450$ nm, F_0) avec des impulsions de lumière actinique ($\lambda = 520$ nm). Des impulsions sont effectuées de 90 à 600 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Le calcul de l'efficacité quantique maximale de PSII (F_v/F_m) est réalisé selon la formule suivante:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / (F_m)$$

Matériel & Méthodes

Avec F_v , la différence entre F_m et F_0 correspondant à la fluorescence variable maximale émise après la fermeture de l'ensemble des centres réactionnels du PSII ; F_m , la fluorescence maximale après une impulsion de lumière saturante sur des cultures adaptées à l'obscurité ; F_0 , la fluorescence à l'état d'équilibre dans les cultures adaptées à l'obscurité.

$Y(II)$ correspond au rendement quantique, c'est-à-dire la quantité de lumière absorbée par les antennes de PSII. Le rendement quantique est calculé selon l'équation :

$$Y(II) = (F_m' - F) / F_m'$$

Avec F_m' , la fluorescence maximale après une impulsion de lumière saturante sur des cultures adaptées à la lumière ; F , la fluorescence dans les cultures adaptées à la lumière.

Le *Non-photochemical quenching* (NPQ) correspond à la réduction de la fluorescence issue de la dissipation par la chaleur (**Figure 57**). Il est calculé selon l'équation :

$$NPQ = (F_m - F_m') / (F_m')$$

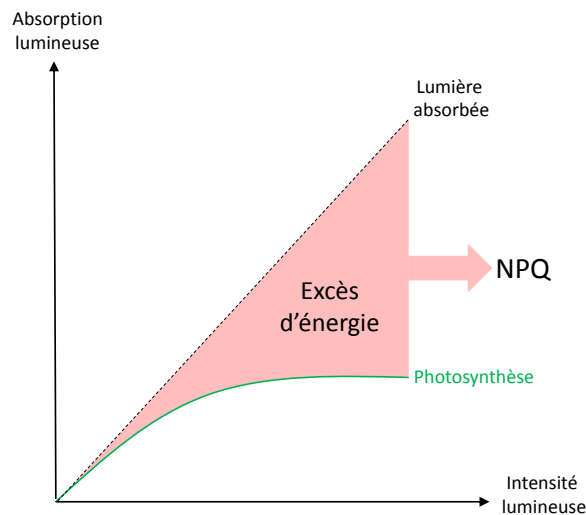


Figure 57 : Représentation schématique de la dissipation de chaleur. Le NPQ correspond à l'excès d'énergie perdue sous forme de chaleur (en rouge).

3.4. Détermination de la teneur en caroténoïdes

Les pigments totaux de cellules de *Phaeodactylum* (cultivées dans du milieu 10N10P ou 00N10P) sont extraits à partir de $1,5 \cdot 10^8$ cellules. Les cellules sont centrifugées à 11000 g pendant 5 minutes à 4°C puis remises en suspension dans 100 μ L de méthanol-Tris-HCl froid (10 mM pH 7,4). L'ensemble de l'extraction est réalisé en maintenant les tubes dans de la glace et à l'obscurité. Après centrifugation à 11000 g pendant 5 min à 4°C, le surnageant est récupéré, maintenu à l'obscurité à 4°C et le culot est soumis à trois extractions

Matériel & Méthodes

supplémentaires avec du méthanol, jusqu'à ce que le culot devienne incolore. Toutes les fractions extraites sont regroupées et séchées sous argon. Les pigments provenant des extraits totaux et de la fraction de gouttelettes lipidiques sont remis en suspension dans 100 μL de diméthylformamide avant injection sur HPLC (Varian ProStar 800, Walnut Creek, CA, USA) couplés à un détecteur à barrette de diodes.

Les caroténoïdes sont séparés sur une colonne en phase inverse C18 (250 x 4,6 mm) (Macherey-Nagel, Hoerd, France) en utilisant la méthode suivante. La phase mobile initiale correspond à du méthanol 80% / acétate d'ammonium 0,5 M 20%. Un gradient linéaire est ensuite appliqué jusqu'à 100% d'un solvant B constitué d'acétonitrile 90% / eau 10% pendant 4 min, suivi d'un gradient linéaire de 20 minutes jusqu'à 80 % d'acétate d'éthyle / 20% de B. Cette composition de solvant est ensuite maintenue pendant 5 minutes. L'identification des caroténoïdes a été réalisée en comparant les temps de rétention et les propriétés spectrales acquises en ligne avec des molécules étalons (fucoxanthine, β -carotène, lycopène).

4. Méthodes d'étude des gouttelettes lipidiques

4.1. Marquage des gouttelettes lipidiques par le rouge de Nil

Les gouttelettes lipidiques peuvent être marquées avec des fluorophores (Rouge de Nil, BODIPY, MDH, AC). Pour les travaux présentés dans ce manuscrit, le rouge de Nil ou 9-diethylamino-5-benzo[α]phenoxazinone (Sigma Aldrich, St Louis, USA) a été utilisé. Un volume de 160 μL de culture de *Phaeodactylum* (entre 1 et $6 \cdot 10^6$ cellules mL^{-1}) est transféré dans une plaque 96 puits à fond noir (Greiner, 655086) dans laquelle 40 μL de rouge de Nil à $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (dissous dans du DMSO 100%) sont ajoutés. Les cellules sont resuspendues et la quantification relative de la fluorescence du rouge de Nil (excitation : 485 nm, émission : 525 nm) est réalisée pendant 20 minutes à l'obscurité. La fluorescence relative du rouge de Nil est normalisée avec la concentration cellulaire (Rfu/millions de cellules).

4.2. Fractionnement des gouttelettes lipidiques de *Phaeodactylum*

La purification de la gouttelette lipidique a été réalisée en triplicat biologique (**Figure 58**). Un volume total de 3 L de culture de *Phaeodactylum* est placé en carence d'azote pendant 7 jours (ESAW 00N10P). Les cultures sont ensuite centrifugées pendant 20 minutes à $6000 \times g$ à 4°C (rotor JLA 10.500, Beckman CoulterTM, Brea, CA, USA) et le culot de cellules est remis en suspension en utilisant un tampon salin (10 mM Tris-HCl, pH 7,6 + 2% de NaCl, p/v). Les cellules sont à nouveau collectées par centrifugation à $6000 \times g$ pendant 20 minutes à 4°C et remises en suspension dans 50 mL de tampon sucrose (1 mM d'EDTA ; 0,25 M de saccharose ; une pastille d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOComplete, Roche Diagnostics) ; Tris-HCl 10 mM pH 7,6). Les cellules sont rompues en utilisant un système de rupture cellulaire (Constant Systems Limited, Daventry, Royaume-Uni) à 2 kbar. L'efficacité

Matériel & Méthodes

de la rupture est contrôlée par imagerie confocale après coloration au Rouge de Nil. Les cellules cassées sont centrifugées à 48000 g (Rotor JA20, Beckman Coulter™, Brea, CA, USA) pendant 20 minutes à 4°C dans des tubes SS34 (Beckman Coulter™, Brea, CA, USA) pour éliminer les plus gros débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et ajusté à une concentration de 1,25 M de saccharose. 4,5 mL sont déposés au fond d'un tube d'ultracentrifugation (SW32ti, Beckman Coulter™, Brea, CA, USA) pour obtenir la première couche du gradient. Une deuxième couche de 7 mL (saccharose 0,7 M ; Triton X-100, 0,2% ; une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOplete, Roche Diagnostics) ; Tris-HCl 10 mM pH 7,6) est déposée délicatement sur la première. Une dernière couche de 1,5 mL (0,25 M de saccharose ; cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOplete, Roche Diagnostics) ; Tris-HCl 10 mM pH 7,6) est également déposée délicatement sur la couche de 0,7 M de saccharose. Les tubes sont ultracentrifugés pendant une nuit (16 heures) à 68000 g à 4°C. Les gouttelettes lipidiques sont récupérées méticuleusement au sommet du tube et transférées dans des tubes de 1,5 mL. Les gouttelettes lipidiques purifiées sont lavées deux fois dans du Tris-HCl (10 mM pH 7,6) à 20000 g pendant 10 minutes à 4°C (Rotor S55A2, Hitachi Koki, Tokyo, Japon). La présence de gouttelettes lipidiques est ensuite observée par imagerie confocale, fixées dans 3% d'agarose-Tris-HCl, 10 mM pH 7,6 (Cf. **Section 7.2.**). Les gouttelettes lipidiques sont divisées en deux fractions : une fraction lipidique et une fraction protéique. La fraction lipidique est cryopréservée dans de l'azote liquide et congelée à -80°C avant extraction par la méthode Bligh & Dyer (Cf. **Section 5.2.**). Un volume d'1 mL d'acétone froid est ajouté dans la fraction protéique pour précipiter les protéines. Les fractions sont placées à -20°C pendant une nuit. Les tubes sont ensuite centrifugés à 20000 rpm à 0°C pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et les culots sont repris dans un volume d'un millilitre l'acétate d'éthyle froid, pour éliminer les dernières traces d'huile, pendant 2 heures à -20°C. Les fractions sont de nouveau centrifugées à 20000 rpm à 0°C pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé, les culots protéiques sont séchés sous hotte avant d'être resuspendus dans le tampon de lyse (7 M urée, 2 M thiourée, 3% Triton X-100 v/v, 4% CHAPS m/v, 2% SDS v/v, 10 mM Tris-HCl, pH=7,6).

Matériel & Méthodes

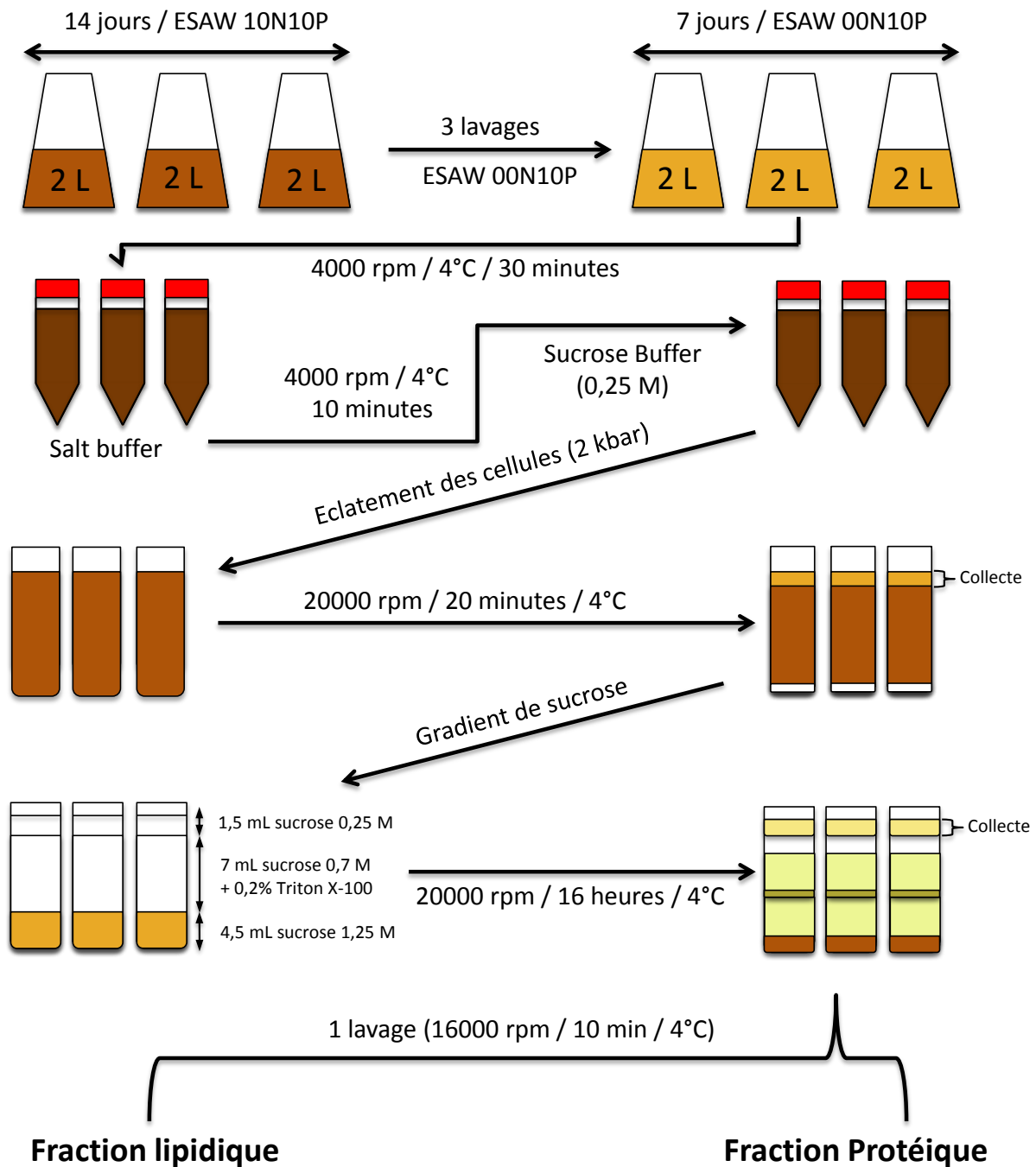


Figure 58 : Représentation schématique d'une purification de gouttelettes lipidiques de *Phaeodactylum tricornutum*.

4.3. Détermination de la taille des gouttelettes lipidiques par RMN diffusionnelle

Des cellules de *Phaeodactylum* carencées en azote (ESAW 00N10P) pendant sept jours sont utilisées pour ces analyses. Une mesure de la taille des gouttelettes lipidiques est réalisée entre les jours 3 et 7 de la carence en azote. 100 mL de microalgues sont centrifugés à 3000 g pendant 7 minutes à 4°C. Environ 200 µL de cellules sont transférées dans un tube RMN shigemi de 5 mm. Les mesures sont réalisées à 4°C avec un spectrophotomètre Bruker AVANCE opérant à 500,18 MHz pour le ^1H au sein du laboratoire de Résonance Magnétique de l'Institut des Nanosciences et Cryogénie (INAC) de Grenoble.

Matériel & Méthodes

Il est équipé d'une sonde BBI à gradient z de 5 mm (**Figure 59**). Pour la quantification en mode de détection directe, les spectres RMN ^1H relaxés sont enregistrés en utilisant la séquence d'impulsion "Purge" de suppression du pic d'eau. La sensibilité de la sonde est quantifiée en utilisant un échantillon avec une quantité connue de saccharose.

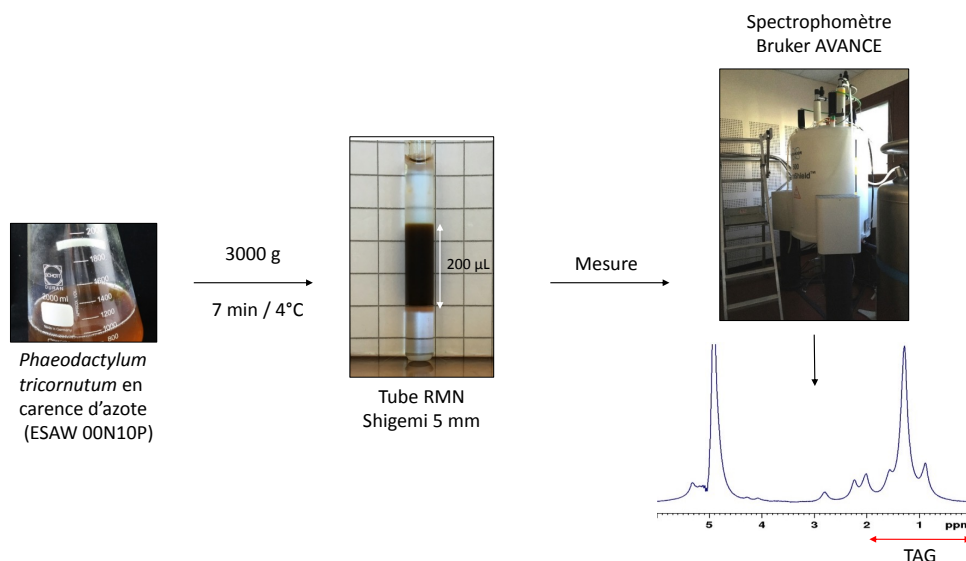


Figure 59 : Schéma expérimental appliqué pour la mesure des dimensions des gouttelettes lipidiques de *Phaeodactylum* par RMN diffusionnelle.

La détermination de la taille des gouttelettes lipidiques est réalisée selon la méthode RMN diffusionnelle décrite par Marina Gromova (Gromova et al., 2015). Les spectres filtrés par diffusion ^1H ont été enregistrés avec la séquence d'impulsion LED bipolaire standard (**Figure 60**). L'amplitude du gradient varie de 30 à 98% de son amplitude maximale. Les expériences sont réalisées selon les conditions suivantes : $\delta = 5$ ms, $\tau = 0,4$ ms et Δ variant de 100 à 450 ms.

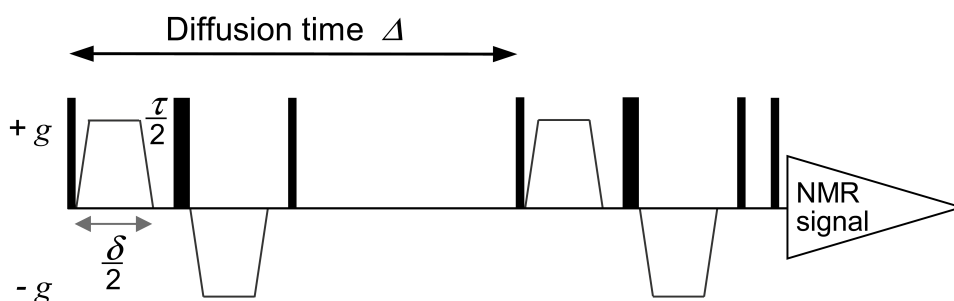


Figure 60 : Séquence d'impulsions bipolaires appliquées pour déterminer le rayon des gouttelettes lipidiques. Deux blocs d'impulsions élémentaires [$\pi/2$, $\delta/2$, $\tau/2$, π , $\delta/2$, $\tau/2$, $\pi/2$] sont séparés par un temps de diffusion plus long ($\Delta - \tau - \delta$). Le temps de montée et le temps de descente des impulsions de gradient équivalent à 10% de la durée totale de l'impulsion (D'après Wu et al, 1995).

Matériel & Méthodes

L'atténuation des signaux RMN suit l'équation :

$$I/I_0 = e^{-(\gamma_H g \delta)^2 (\Delta - (\delta/3) - (\tau/4)) \times D}$$

Avec I, l'intégrale du signal TAG avec l'application d'un champ magnétique ; I_0 , l'intégrale du signal TAG sans l'application d'un champ magnétique ; γ , le ratio gyromagnétique ^1H ; g , la force des impulsions gradients du champ magnétique ; δ , la durée des impulsions gradients du champ magnétique ; Δ , le délai de diffusion moléculaire et D , le coefficient de diffusion de la molécule de TAG.

Le rayon moyen des gouttelettes lipidiques (Tanner & Stejskal, 1968) de *Phaeodactylum tricornutum* est déterminé par la formule :

$$\text{Rayon} = (5D_{\text{meas}} \times \Delta)^{1/2}$$

Avec D_{meas} , la mesure du coefficient de diffusion des molécules de TAG et Δ , le délai de diffusion moléculaire.

5. Méthodes d'étude des lipides

5.1. Extraction des glycérolipides selon la méthode de Folch

La méthode de Folch (Folch et al., 1957) a été utilisée pour extraire les lipides totaux de *Phaeodactylum*. Environ 3.10^8 cellules sont centrifugées à 4000 rpm pendant 7 minutes à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots cryopréservés dans de l'azote liquide avant congélation à -80°C. Les culots sont lyophilisés sur une nuit (Christ alpha 2-4 LD plus). Les poudres de microalgues sont ensuite broyées dans de l'azote liquide puis transférées rapidement dans des tubes Corex contenant 4 mL d'éthanol préalablement chauffé. Les échantillons sont placés 5 minutes dans un bain marie à 85°C afin d'inhiber les activités enzymatiques des lipases présentes dans l'échantillon. 2 mL de méthanol sont ensuite ajoutés suivi de 8 mL de chloroforme. Le mélange est homogénéisé par un bullage à l'argon d'une minute. L'argon permet également de protéger les lipides de l'oxydation. Les échantillons sont laissés au repos à température ambiante pendant 1 heure. Les échantillons sont ensuite filtrés avec de la laine de quartz afin de se débarrasser des débris cellulaires se trouvant au fond du tube après la phase de repos. La séparation de la phase organique (contenant les lipides) et hydrophile est réalisée par ajout de 3 mL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) et de 5 mL de NaCl 1%. Les échantillons sont soumis à un bullage sous argon pendant 1 minute puis centrifugés pendant 10 minutes à 2000 rpm à température ambiante.

Matériel & Méthodes

La phase inférieure contenant les lipides est récupérée et évaporée sous argon. Les extraits lipidiques totaux sont conservés à -20°C.

5.2. Extraction des glycérolipides selon la méthode de Bligh & Dyer

L'extraction, selon la méthode de Bligh & Dyer, est réalisée directement soit sur un culot de gouttelettes lipidiques de *Phaeodactylum* cryopréservé dans de l'azote liquide et congelé à -80°C soit sur de la silice contenant les glycérolipides. 1,35 mL de chloroforme/méthanol (1:2, v/v) sont ajoutés directement sur le culot congelé. Le mélange est agité à l'aide d'un vortex pendant 1 minute puis soumis à un bullage sous argon. 450 µL de chloroforme sont ajoutés. Le mélange est de nouveau agité doucement. 800 µL d'eau est ajouté pour réaliser la biphasé. Le mélange est de nouveau agité doucement, puis incubé 10 minutes à température ambiante. Une centrifugation de 10 minutes est réalisée à 3000 rpm à température ambiante. La phase inférieure est transférée dans un tube à hémolyse en verre à l'aide d'une pipette pasteur. Les lipides sont évaporés sous argon. Une deuxième extraction du mélange est réalisée par ajout de 1,2 mL de chloroforme propre dans le tube. Un biphasé se forme à nouveau. Après bullage sous argon et repos de 10 minutes à température ambiante, le tube est de nouveau centrifugé 10 minutes à 3000 rpm à température ambiante. La phase inférieure est transférée dans le tube en verre contenant la première extraction. Le tube est évaporé à sec et stocké à -20°C.

5.3. Quantification des extraits totaux par GC-FID ou GC-MS/FID

5.3.1. Méthanolyse des extraits totaux

La méthanolyse est une réaction d'estérification nucléophile visant à décrocher les acides gras du squelette glycérol. La méthanolyse est réalisée sur 10 µL (1/100) des extraits totaux de *Phaeodactylum*. Un standard interne, un acide gras à 15 atomes de carbones (C15:0 à 10 µg, Sigma Aldrich) est ajouté au mélange. La réaction de méthanolyse est réalisée avec 3 mL de méthanol:acide sulfurique (40:1, v/v) pendant 1 heure à 100°C. Les tubes sont refroidis 5 minutes. 3 mL d'eau et 3 mL d'hexane sont ensuite ajoutés, mélangés et laissés au repos pendant 20 minutes à température ambiante. La phase supérieure, contenant les acides gras méthylés, est prélevée et mise à évaporer. Les lipides sont récupérés une deuxième fois par ajout de 3 mL d'hexane. Le milieu est mélangé et la phase supérieure est collectée et évaporée sous argon après 20 minutes d'attente. Les esters méthylés sont stockés à -20°

5.3.2. Dosage par GC-FID ou GC-MS/FID

Les esters méthylés d'acides gras sont concentrés dans 200 µL d'hexane et évaporés sous argon. Ils sont ensuite re-suspendus dans 40 µL d'hexane et analysés par chromatographie

Matériel & Méthodes

en phase gazeuse (GC) couplée à un détecteur d'ionisation de flamme (FID) et/ou un spectromètre de masse (GC-MS/FID). Les analyses sont réalisées à l'aide d'un GC-FID Perkin Elmer Clarus 580 ou un GC-FID/MS Perkin Elmer Clarus SQ8 équipées d'une colonne de cyanopropyl polysilphènesiloxane BPX70 (SGE) de 30 m de long, de diamètre interne 0,22 mm et d'une épaisseur de film de 0,25 µm pour la GC-FID ou d'une colonne de 60 m de long, de diamètres interne 0,22 mm et d'une épaisseur de 0,25 µm pour la GC-FID/MS. La température est croissante de 130 à 180°C pour la GC-FID et de 150 à 250°C pour la GC-MS/FID. L'azote est utilisé comme gaz vecteur. Les esters méthylés sont identifiés suivant leur temps de rétention (dépendant du nombre de carbones et du nombre d'insaturations) et par comparaison avec ceux de standards (Sigma Aldrich) pour la GC-FID. Les esters méthylés sont identifiés par leur spectre de fragmentation pour la GC-FID/MS. La quantification des espèces moléculaires est réalisée par analyse de la surface des pics et par le rapport obtenu avec celui du standard interne C15:0 (Sigma).

5.4. Quantification des glycérolipides

5.4.1. Séparation par TLC et dosage par GC-FID

Les glycérolipides (polaires et neutres) sont séparés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice (silica gel 60, Merck, 20 x 20 cm). Les extraits lipidiques totaux sont repris dans du chloroforme. 300 µg de lipides totaux sont déposés sur une plaque de chromatographie couche mince (thin layer chromatography, TLC) (**Figure 61**).

La migration des lipides neutres s'effectue pendant 1 heure dans le mélange de solvant suivant : Hexane:Diethylester:Acide acétique (70:30:1, v/v/v). Un standard DAG (Sigma Aldrich) et TAG (huile de colza) sont déposés sur la plaque afin d'identifier plus facilement les glycérolipides neutres.

Concernant les lipides polaires, une première migration (Sens 1) est réalisée dans un mélange de solvant Chloroforme:Méthanol:Eau (65:25:4, v/v/v) pendant 1h30. La plaque est séchée et laissée sous cloche saturée à l'argon sur la nuit. La deuxième migration (Sens 2) est réalisée dans un mélange Chloroforme:Acétone:Méthanol :Acide acétique :Eau (50:20:10:10:5, v/v/v/v/v) pendant 1h30.

Les glycérolipides polaires et neutres sont révélés après une pulvérisation d'ANS (acide-8-anilino-1-naphtalène sulfonique, 0,2%, p/v dans du méthanol) et visualisés sous UV grâce à un TLC vizualizer (CAmag, Muttenz, Suisse). Les glycérolipides sont récupérés par grattage des plaques de silice, extraits puis quantifiés par GC-FID.

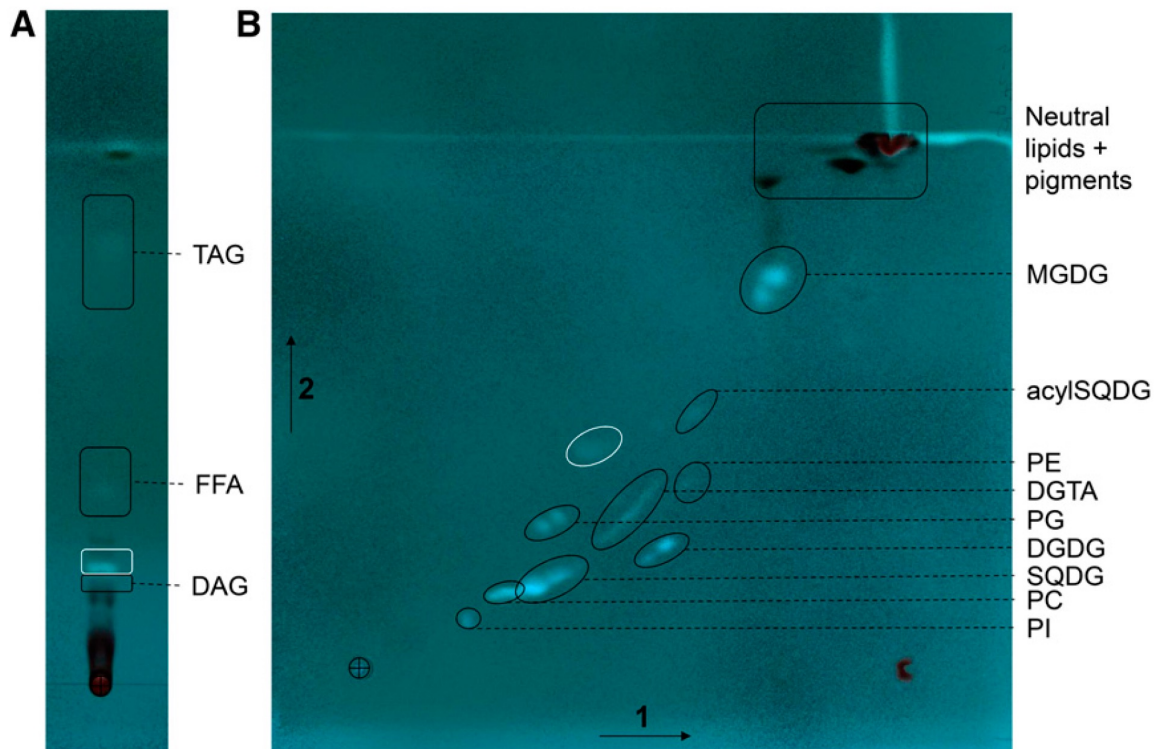


Figure 61 : Séparation par Chromatographie sur couche mince des glycérolipides de *Phaeodactylum* Pt1. A : Séparation en une dimension des lipides non polaires (DAG et TAG) et des acides gras libres (FFA). **B :** Séparation en deux dimensions des glycérolipides membranaires polaires de *Phaeodactylum* (d'après Abida *et al.*, 2015).

5.4.2. Dosage des glycérolipides par LC-MS/MS

Les dosages de glycérolipides par LC-MS/MS sont effectués sur le plateau technique du LPCV dirigé par Juliette Jouhet et Fabrice Rébeillé. 25 nmol des acides gras totaux ont été remis en suspension dans 100 μ L de chloroforme / méthanol (2:1 v/v) contenant 125 pmol de standards internes et analysés comme décrit dans (Jouhet *et al.*, 2017). Les standards internes utilisés sont le DAG 18:0-22:6 (Avanti Polar Lipid, Alabaster, USA), la PE 18:0-18:0 (Avanti Polar Lipid, Alabaster, USA) et le SQDG 16:0-18:0, extrait des thylakoïdes d'épinard (Demé *et al.*, 2014) et hydrogéné comme décrit par (Buseman *et al.*, 2006). Les lipides ont ensuite été séparés par HPLC et quantifiés par MS/MS. La méthode de séparation par HPLC a été adaptée précédemment (Rainteau *et al.*, 2012). Les classes de lipides sont séparées en utilisant un système HPLC Agilent 1200 couplé à une colonne de diol 5 μ m de 150 mm x 3 mm (longueur x diamètre interne) (Macherey-Nagel, Hoerd, France) à 40°C. Les phases mobiles sont constituées d'hexane/isopropanol/eau /acétate d'ammonium 1 M, pH 5,3 [625/350/24/1, (v/v/v/v)] (A) et d'isopropanol/eau/acétate d'ammonium 1 M, pH 5,3 [850/149/1, (v/v/v/v)] (B). Le volume d'injection est de 20 μ L. Après 5 min, le pourcentage de B est augmenté linéairement de 0% à 100% en 30 minutes et est maintenu à 100% pendant 15

Matériel & Méthodes

min. Cette séquence d'élution est suivie d'un retour à 100% de A en 5 minutes et d'un équilibrage de 20 minutes avec 100% de A avant la prochaine injection, conduisant à une durée totale de fonctionnement de 70 minutes. Le débit de la phase mobile est de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. Les différentes classes de glycérolipides sont éluées successivement en fonction de leurs têtes polaires. L'analyse par spectrométrie de masse est réalisée sur un spectromètre de masse de type triple quadrupole 6460 (Agilent, Santa Clara, USA) équipé d'une source d'ions electrospray de type Jetstream (gaz utilisé : azote) dans les conditions suivantes : température du gaz de séchage, 260°C ; flux du gaz de séchage, 13 L.min⁻¹ ; température du gaz d'enveloppe, 300°C ; flux du gaz d'enveloppe, 11 L.min⁻¹ ; pression du nébuliseur, 25 psi ; tension capillaire, ± 5000 V ; tension de buse, ± 1000 V. L'azote est utilisé comme gaz de collision. Les quadrupôles Q1 et Q3 sont exploités pour la résolution la plus large et la résolution unitaire respectivement. Les analyses de la PC et du DGTA ont été effectuées en mode d'ions positifs en recherchant des précurseurs de m/z 184, 236 et aux énergies de collision (CE) de 34 eV et 52 eV respectivement. L'analyse du SQDG est réalisée en mode ion négatif par balayage des précurseurs de m/z -225 à CE de -56 eV. Les mesures des PE, PI, PG, MGDG et DGDG sont effectuées en mode ions positifs en recherchant des pertes de neutres de 141 Da, 277 Da, 189 Da, 179 Da et 341 Da aux CE de 20 eV, 12 eV, 16 eV, 8 eV et 8 eV, respectivement. La quantification est effectuée en utilisant un suivi de réaction multiple (MRM – *Multiple Reaction Mode*) avec un temps de séjour de 40 ms. Les spectres de masse ont été traités par le logiciel MassHunter Workstation (Agilent, Santa Clara, USA) pour l'identification et la quantification des lipides. Les quantités de lipides (pmol) sont corrigées pour les différences de réponse entre les standards internes et les lipides endogènes et par comparaison avec un contrôle qualité (QC). L'extrait du QC correspond à un extrait de lipides de *Phaeodactylum* qualifié et quantifié par chromatographie sur couche mince et GC-FID (Jouhet et al., 2017).

5.5. Extraction et quantification des oxylipines non-enzymatiques

L'extraction et le dosage des oxylipines non-enzymatiques sont réalisés sur des extraits totaux de *Phaeodactylum tricornutum* traités avec du H₂O₂. Les analyses ont été réalisées par l'équipe « Synthèse de Lipides Bioactifs » dirigée par Thierry Durand au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier.

30 mg de poids sec de cellules de *Phaeodactylum* traitées avec des doses croissantes de peroxyde d'hydrogène sont broyées dans 1 mL d'hydroxytoluène butylé (BHT) à 0,025% (p/v) dans du méthanol, en utilisant un FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) pendant 30 minutes à 6.5 m.s⁻¹. 500 μL de chloroforme glacé sont ajoutés. Les échantillons sont agités à l'aide d'un vortex, puis transférés dans un falcon 15 mL. 500 μL de chlorofome glacé est ajouté pour rincer le tube à hémolyse.

Matériel & Méthodes

Les échantillons sont transférés dans des tubes de 15 mL (Falcon), complétés avec 1 mL de MeOH, 1,5 mL de tampon phosphate (pH 2), 6 µL de mélange de standards d'isoprostanoïdes et agités pendant 1 heure à 100 tours par minute à température ambiante. Le mélange est centrifugé à 5000 tours min⁻¹ pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré et 4 mL de chloroforme froid ont été ajoutés. Les échantillons sont ensuite agités pendant 30 secondes et centrifugés à 5000 tours min⁻¹ pendant 5 minutes à température ambiante. La phase chloroformique est séparée et concentrée sous N₂ (0,7 bar) à 40°C pendant 1 heure. L'hydrolyse est ensuite effectuée avec 950 µL de KOH 1 M mélangés pendant 30 minutes à 40°C. Un volume d'un mL d'acide formique 0,04 M (pH 4,5) est enfin ajouté.

Une procédure d'extraction en phase solide (SPE) est effectuée avec des cartouches de polymère Oasis MAX pré-conditionné avec 2 mL de méthanol et équilibré avec 2 mL d'acide formique (0,02 M, pH 4,5). Les échantillons sont chargés sur les cartouches et des lavages successifs sont effectués en utilisant 2 mL de NH₃ 2% (v/v), 2 mL de méthanol / acide formique 0,02 M, un mélange pH 4,5 (30:70), 2 mL d'hexane et 2 mL du mélange hexane / acétate d'éthyle (70:30). Les colonnes sont séchées pendant 5 minutes. Les PhytoPs, NeuroP et IsoPs retenus sont élués avec deux applications d'1 mL d'un mélange hexane / éthanol / acide acétique (70:29,4:0,6). Les échantillons sont concentrés sous N₂ à 40°C pendant 30 minutes et ont été reconstitués dans 100 µL de phase mobile (eau / acétonitrile avec de l'acide formique à 0,1%, 83:17) pour l'injection. Les analyses par spectrométrie de masse sont réalisées sur un spectromètre SCIEX QTRAP 5500 AB (Sciex Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). La source d'ionisation est un électrospray (ESI), fonctionnant en mode négatif. La tension de la source est maintenue à -4,5 kV et l'N₂ est utilisé comme gaz vecteur. La détection des produits ioniques de fragmentation de chaque molécule déprotonée de PhytoP, NeuroP et IsoP [M-H]⁻ est réalisée dans le mode de suivi multi-réactions (MRM). La quantification des PhytoPs, NeuroPs et IsoPs est réalisée en mesurant la surface sous le pic spécifique en utilisant le logiciel MultiQuant 3.0 (Sciex Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Les valeurs sont normalisées en fonction de la concentration cellulaire. La concentration des analytes est obtenue grâce à des courbes étalons, calculées par le rapport de surface des analytes et du standard interne.

5.6. Extraction et quantification des stérols esters

Le dosage des stérols esters est réalisé sur des extraits totaux de *Phaeodactylum* (cultivé en milieu ESAW 10N10P et ESAW 00N10P) ainsi que sur des échantillons purifiés de gouttelettes lipidiques de *Phaeodactylum*. Les analyses ont été réalisées par l'équipe « Biologie d'isoprénoides végétaux » dirigé par Hubert Schaller au sein de l'Institut de Biologie Moléculaires des Plantes (IBMP) de Strasbourg.

Matériel & Méthodes

Dans le cas des gouttelettes lipidiques, l'échantillon est dissout dans 500 μL de benzène et stockés à -20°C . Des aliquots (1/10 en vol.) sont utilisés comme échantillons d'essai pour évaluer les TIC (*Total Ion current Chromatogram*) obtenus en GC-MS. Les échantillons sont traités par moitié comme suit. Les extraits séchés sont saponifiés dans 300 μL de KOH à 6% dans du MeOH pendant 1 heure à 70°C . 0,5 volume d'eau est ajouté au mélange. Les composés non saponifiables sont extraits avec trois volumes de n-hexane. Le résidu séché est acétylé dans du toluène (100 μL) en présence d'anhydride acétique (50 μL) et de pyridine (40 μL) à 70°C pendant 1 heure. Les réactifs sont séchés à l'air (courant d'air chaud). L'extrait est ensuite dissous dans du n-hexane (100 à 300 μL) dans des flacons de GC (flacons avec inserts). En variante, les extraits séchés sont séparés sur des plaques de chromatographie couche mince (*thin layer chromatography*, TLC) (Merck 60F254) en utilisant du dichlorométhane comme solvant de développement. Une série de TLC permet d'obtenir des fractions résolues de stérols libres à $R_f = 0,14$ et d'esters de stérols (esters d'acides gras) à $R_f = 0,86$. Le cholestérol commercial et l'oléate de cholestérol sont utilisés comme standards de TLC. Les fractions contenant des stérols libres et des esters de stérol sont extraites de la plaque. Les esters de stérol sont saponifiés comme décrit ci-dessus. Les résidus sont ensuite acétylés et analysés par GC-MS. Le programme de température du four d'un chromatographe Agilent 6890 couplé à un détecteur sélectif de masse Agilent 5973 (GC-MS) comprend une pente abrupte de 60°C à 220°C ($30^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) puis un gradient de température de $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 220°C à 300°C , suivie d'un plateau de 10 min. Les composés sont séparés sur une colonne HP5-MS (Agilent, Santa Clara, USA) de 30 m de long, 0,32 mm de diamètre intérieur, 0,25 mm d'épaisseur de film et 2 mL d'hydrogène comme gaz vecteur, et sont identifiés par leurs spectres de masse. L'acétate de brassicastéryle est détecté à $R_t = 34,5$ min, son spectre de masse à EI 70 eV [$M + -\text{ROH}$ 380 (100), $M + -\text{CH}_3-\text{ROH}$ 365 (5), $M + -\text{SC}-\text{ROH}$ 255 (25)] est identique à un standard interne correspondant.

6. Méthodes d'étude des protéines

6.1. Extraction des protéines

Les protéines sont extraites d'après un protocole modifié de la méthode Tanaka (Hurkman & Tanaka, 1986). Environ 30 mg de cellules lyophilisées sont broyées dans l'azote liquide à l'aide d'un pilon dans 700 μL de tampon Tanaka (0,7 M de sucrose, 0,5 M de Tris, 30 mM de HCl, 50 mM d'EDTA, 0,1M de KCl, 2 mM PMSF, 2% β -mercaptoéthanol, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche)). 700 μL de phénol (pH 7,5) est ajouté dans l'éppendorf qui est agité à l'aide d'un vortex pendant 1 minute. Le tube est centrifugé à 14000 rpm pendant 5 minutes à 4°C . La phase supérieure pigmentée contenant les protéines est récupérée. Les protéines sont précipitées avec 1 mL d'acétate d'ammonium 0,1M / méthanol froid pendant une nuit à -20°C . Les tubes sont ensuite centrifugés à 14000 rpm pendant 5 minutes à 4°C . Les culots blancs sont lavés 2 à 3 fois avec 1 mL d'acétate d'ammonium 0,1

Matériel & Méthodes

M / méthanol afin d'éliminer toute trace de pigments. Les culots sont ensuite rincés délicatement et rapidement avec de l'acétone 100% froid. Les culots sont séchés sous hotte pendant 30 minutes. Ils sont ensuite resuspendus dans un tampon de lyse (8 M urée, 1 mM EDTA, 5% β -mercaptoéthanol, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8).

6.2. Dosage des protéines

6.2.1. Méthode de Bradford

La concentration des protéines est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le dosage est réalisé en parallèle d'une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA) (Concentration stock à 2 mg mL^{-1} dans 0.9% de NaCl contenant de l'azoture de sodium, Thermo Scientific) (**Figure 62**) réalisée pour chaque expérience. L'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Biophotometer D30 (Eppendorf).

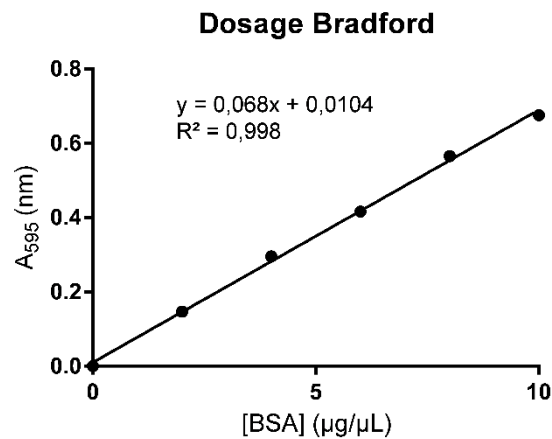


Figure 62 : Exemple de gamme étalon de BSA permettant de déterminer la concentration d'échantillons protéiques.

6.2.2. Coloration au nitrate d'argent

Cette méthode est utilisée pour réaliser une estimation de la quantité de protéines dans des extraits purifiés de gouttelettes lipidiques. En effet, le dosage par la méthode de Bradford est rendu impossible 1) car la quantité de protéines est très faible et 2) du fait de la présence de certains détergents (CHAPS, Triton X-100) dans le tampon de lyse des gouttelettes lipidiques. Nous avons utilisé le protocole du SilverQuestTM staining kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) pour réaliser une coloration au nitrate d'argent après migration des protéines. Bien que, non strictement quantitative, cette méthode permet une estimation sommaire (un ordre de grandeur) par comparaison avec un profil protéique de quantité connue.

Matériel & Méthodes

6.3. Immunodétection de protéines (Western Blot)

6.3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet de séparer les polypeptides en fonction de leur masse moléculaire. Dans un premier temps, les échantillons protéiques sont resuspendus dans un tampon dénaturant et chargeant négativement les protéines (Tris-HCl 0,25M pH 7,8, glycérol 40 M, SDS 8M, β -mercaptoéthanol 5M, bleu de bromophénol 0,04M). La dénaturation est achevée à 95°C pendant 5 minutes. La migration des protéines s'effectue en deux étapes (80V pendant 30 minutes, puis 1h30 à 100V): elles sont tout d'abord concentrées dans le gel supérieur (acrylamide 5%, pH 6,5) puis séparées selon leur tailles dans le gel de séparation (acrylamide 12%, pH 8,8) (Chua et al., 1980). La migration s'effectue en parallèle d'un marqueur de taille Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad, Hercules, USA). Les protéines séparées sont colorées au bleu de Coomassie (InstantBlue™, Expedeon, San Diego, USA) sur une nuit.

6.3.2. Transfert des protéines

Une membrane de nitrocellulose (TransBlot® Turbo™ Midi-size Nitrocellulose 8,5 cm x 13,5 cm, BioRad, Hercules, USA) et des papiers Wattmann de tailles identiques au gel SDS-PAGE sont plongés dans un bain contenant 20% de Trans-Blot® Turbo™ 5X Transfer Buffer (BioRad, Hercules, USA), 30 % d'éthanol et 50% d'eau. Un transfert semi-sec est réalisé à l'aide d'un système Trans-Blot Turbo™ Transfert System (BioRad, Hercules, USA) pendant 10 minutes à 1,3 A et 25 V. Après migration, la membrane de nitrocellulose et le gel sont rincés deux fois 5 minutes dans de l'eau. Le gel est coloré au bleu de Coomassie (InstantBlue™, Expedeon, San Diego, USA) pendant 1 heure afin d'évaluer la qualité du transfert. La membrane de nitrocellulose est colorée de façon réversible, pendant 2 minutes, dans du Rouge Ponceau (0,2% p/v avec 3% de d'acide trichloroacétique), puis est décolorée avec de l'eau jusqu'à visualisation des protéines. Une photographie de la membrane de nitrocellulose est réalisée avec un Gel Doc™ et est analysée grâce au logiciel Image Lab™ version 5.1. (BioRad, Hercules, USA). La membrane de nitrocellulose est ensuite décolorée par des bains successifs dans du TBS 1X (Tris-HCl, 50 mM - pH 7.5, NaCl 50 mM).

6.3.3. Immunomarquage des protéines

La membrane de nitrocellulose est saturée pendant 1 heure dans une solution de TBS-lait 5%. Cinq anticorps utilisés dans cette étude ont été obtenus de sources commerciales (Agriser, Vännäs, Suède). Par ailleurs, nous avons développés une série d'anticorps (prestation auprès de Biotem, Apprieu, France) afin suivre des contaminations éventuelles au cours d'un fractionnement de gouttelettes lipidiques. Les peptides servant d'épitopes ont été sélectionnés pour permettre la production d'anticorps dirigés contre des protéines

Matériel & Méthodes

marqueurs de certains compartiments cellulaires de *Phaeodactylum*. Les anticorps primaires sont incubés sur la nuit dans du TBS-Lait 0,5% à la dilution indiquée dans le **Tableau 14**. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 minutes avec du TBS-lait 0,5% - Tween 0,1% et incubée 3 heures avec un anticorps secondaire anti-lapin (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson Immunoresearch) dans du TBS-lait 0,5%- Tween 0,1% à une dilution de 1/10000, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

6.3.4. Détection des protéines par *enhanced chemiluminescent* (ECL)

La membrane de nitrocellulose est lavée trois fois (10 minutes) dans du TBS-Tween 0,1%. La révélation s'effectue grâce au kit Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, Hercules, USA). La Horseradish peroxydase (HRP), couplée à l'anticorps secondaire catalyse la réaction d'oxydation du luminol. Le composé est oxydé émettant une lumière à 428 nm détectée à l'aide d'un système de détection ChemiDoc™ HP (BioRad, Hercules, USA).

Matériel & Méthodes

	Anticorps primaire	Cible	Poids Moléculaire (kDa)	Clonalité	Hôte	Compartiment Cellulaire	Référence	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Anticorps produit (Biotem)	Anti-StLDP	StLDP	49	Polyclonal	Lapin	Gouttelette lipidique	Yoneda et al., 2016	1/1000	Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	1/10000
	Anti-CGI58	CGI58	55,5			Peroxisome ?	Leterrier et al., 2015	1/1000		
	Anti-PEX3	PEX3	43			Peroxisome	Gonzalez et al., 2011	1/1000		
	Anti-ACL1	ACL1	73,5			Peroxisome	Montsant et al., 2005	1/1000		
	Anti-CNX	CNX	47			Réticulum endoplasmique	Huang et al., 1993	1/5000		
	Anti-COP1	COP1	32			Réticulum endoplasmique	Donova et al., 2015	1/1000		
	Anti-Seipin	Seipin	48			Réticulum endoplasmique ?	Lu et al., 2017	1/1000		
	Anti-TPT1	TPT1	36			Chloroplaste	Moog et al., 2015	1/1000		
	Anti-TPT4a	TPT4a	40			Chloroplaste	Moog et al., 2015	1/1000		
	Anti-TPT4b	TPT4b	41			Chloroplaste	Moog et al., 2015	1/1000		
	Anti-RAE1	RAE1	38			Enveloppe Nucléaire	Neumann et al., 2010	1/1000		
Anticorps Commerciaux (Agrisera)	Anti-ATPβ	ATPβ	53			Mitochondrie ou Chloroplaste	Subota et al., 2011	1/2000		
	Anti-PsbA	PsbA	28-30			Chloroplaste - Thylakoïdes	Du et al., 2018	1/1000		
	Anti-PsaC	PsaC	9			Chloroplaste - Thylakoïdes	Du et al., 2018	1/1000		
	Anti-Sec21p	Sec21p	98			Réticulum endoplasmique	Pimpl et al., 2000	1/1000		
	Anti-H4K16ac	Histone H4	15			Noyau - Chromatine	Tirichine et al., 2014	1/1000		

Tableau 14 : Synthèse des anticorps utilisés dans le cadre de cette thèse.

6.4. Analyse protéomique par spectrométrie de masse

Les analyses protéomiques des extraits purifiés de gouttelettes lipidiques ont été réalisées par la plateforme Edyp au sein du Laboratoire de Biologie à Grandes Echelles (CEA Grenoble).

6.4.1. Digestion des protéines

Les fractions de gouttelettes lipidiques sont préparées en triplicat biologique. 25 μ L de chaque échantillon sont chargés sur un gel SDS-PAGE (NuPAGE 4-12%, Invitrogen, Carlsbad, USA) et une migration des protéines dénaturées est réalisée sur une distance de 60 mm afin de séparer le front lipidique potentiel de la teneur en protéines. Après coloration au bleu de Coomassie (R250, BioRad, Hercules, USA), la zone de gel contenant les protéines est excisée manuellement et découpée en 8 bandes pour une digestion en gel avec de la trypsine à l'aide d'un système robotisé Freedom EVO150 (Tecan Trading AG, Männedorf, Suisse). Les bandes excisées des gels sont lavées six fois par des incubations successives dans du NH_4HCO_3 25 mM et ensuite dans du CH_3CN à 50% (v/v), 25 mM NH_4HCO_3 25 mM. Après déshydratation dans du CH_3CN pur, une réduction avec du DTT 10 mM est réalisée dans du NH_4HCO_3 25 mM (45 min à 53°C) suivi d'une alkylation avec de l'iodoacétamide 55 mM dans du 25 mM NH_4HCO_3 (35 min dans l'obscurité). L'alkylation est arrêtée par l'addition de 10 mM de DTT dans du NH_4HCO_3 25 mM pendant 10 minutes. Les morceaux de gel sont ensuite lavés à nouveau dans du NH_4HCO_3 25 mM et déshydratés avec de l'acétonitrile pur. La trypsine modifiée (qualité de séquençage, Promega) dans 25 mM de NH_4HCO_3 est ajoutée aux morceaux de gel déshydraté et l'incubation a été réalisée à 37°C pendant une nuit. Les peptides sont extraits des morceaux de gel en trois étapes d'extraction séquentielles (30 min) v) CH_3CN , 30 μ L d'acide formique à 5% (v/v), et finalement 30 μ L de CH_3CN pur. Les surnageants rassemblés sont séchés sous vide.

6.4.2. Analyse des peptides par nano-LC-MS/MS

Les peptides extraits séchés sont remis en suspension dans 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide trifluoroacétique et analysés par nano-LC-MS/MS en ligne (NCS, et Q-Ex_HF, Thermo Fischer Scientific). Les mélanges peptidiques sont dessalés en ligne à l'aide d'une précolonne à phase inverse (Colonne Reprosyl PUR C18 AQ 1,9 μ m, 250 mm * 0,075 mm ID de chez Cluzeau) et résolus sur colonne C18 (Acclaim PepMap 100 C18, granulométrie 3 μ m, taille des pores 100 Å, 25 cm x 75 μ m, Dionex). Les peptides sont séparés en utilisant des gradients de 140 min allant de 4% à 50% d'acétonitrile dans de l'acide formique à 0,1% en 123 min et un lavage à 90% et un équilibrage à 4% à un débit de 300 nL.min⁻¹. Les données MS et MS/MS sont acquises en utilisant Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). La tension de pulvérisation est réglée à 2 kV et le capillaire chauffé est ajusté à 270°C. Des

Matériel & Méthodes

spectres de MS à balayage complet ($m/z = 400-1600$) sont obtenus dans l'Orbitrap après l'accumulation de 10^6 ions (temps de remplissage maximum: 200 ms). Les 20 ions les plus intenses issus du scan d'aperçu rendu par l'Orbitrap sont fragmentés par dissociation induite par collision dans le LTQ après l'accumulation de 10^5 ions (temps de remplissage maximum: 50 ms).

6.4.3. Recherche des fragments peptidiques dans les bases de données et traitement des résultats de spectrométrie de masse

Suite à l'analyse des fragments peptidiques par nano-LC-MS/MS, les fichiers bruts générés sont traités en utilisant le logiciel MaxQuant version 1.5.8.3 (Cox and Mann, 2008). Les spectres sont comparés à une compilation de la base de données de protéines de *Phaeodactylum* du portail EnsemblProtists (*Phaeodactylum_tricornutum*.ASM15095v2.pep.all.fasta, 12178 entrées), les protéines prédites pour leurs présences dans des organites (« organellar » ; 165 entrées) et la base de données de contaminants fréquemment observée incorporée dans MaxQuant. La trypsine/P a été choisie comme enzyme et 2 clivages manquants ont été autorisés. Les tolérances d'erreurs de masse des précurseurs ont été fixées respectivement à 20 ppm et 4,5 ppm pour les premières et principales recherches. La tolérance d'erreur de masse de fragment a été fixée à 20 ppm. Les modifications du peptide permises pendant la recherche étaient: carbamidométhylation (C, fixe), acétylation (protéine N-ter, variable) et oxydation (M, variable). La longueur de peptide minimum a été fixée à 7 acides aminés. Le nombre minimum de peptides uniques a été fixé à 1. Les taux de fausses découvertes maximums, calculés en utilisant une stratégie de base de données inverse, ont été fixés à 0,01 aux niveaux peptidiques et protéiques. Pour la quantification, l'option "Match between runs" a été autorisée avec un temps de correspondance réglé à 0,7 min. La protéine iBAQ a été utilisée pour la quantification (Schwanhausser et al., 2011).

Un classement a été réalisé pour évaluer l'abondance de chaque protéine dans la préparation des gouttelettes lipidiques. Premièrement, les protéines qui n'ont pas été quantifiées dans les trois réplicats ont été rejetées. Les valeurs iBAQ ont été normalisées à la somme de toutes les intensités dans chaque réplique. Les protéines ont été classées en fonction de la somme des iBAQ normalisés (ordre décroissant) incluant ainsi les valeurs manquantes avec iBAQ = 0. Alternativement, un rang a également été calculé en utilisant la moyenne des iBAQ, sans tenir compte des valeurs manquantes. Pour les annotations: les descriptions des protéines ont été obtenues à partir du fichier Ensembl fasta. Cette annotation fonctionnelle a été complétée par des annotations expertes obtenues à partir de la version du gène correspondant à JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/Phatr2> et https://genome.jgi.doe.gov/Phatr2_bd). La prédiction des hélices transmembranaires dans

les protéines a été réalisée au TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) (Sonnhammer et al., 1998) et les valeurs de points isoélectriques ont été prédites en utilisant le programme IPC Isoelectric Point Calculator autonome. (<http://isoelectric.ovh.org/>) (Kozlowski, 2016).

7. Méthodes d'imagerie

7.1. Microscopie à épifluorescence

Un microscope à épifluorescence (Zeiss AxioScope A1) est utilisé en routine au laboratoire pour observer des cultures cellulaires. Les gouttelettes lipidiques sont observées à l'aide d'un filtre Fluorescein isothiocyanate (FITC: Excitation 488 nm / Emission 519 nm).

7.2. Microscopie confocale

Les images produites par microscopie confocale ont été réalisées à l'aide d'un microscope Zeiss LSM800 équipé d'une ouverture numérique Zeiss Plan-APO x63 et d'un objectif à immersion 1.46 agrandissant x4 (Plateforme μ Life, BIG, LPCV). Les gouttelettes lipidiques ont été marquées au Rouge de Nil pendant 20 minutes à l'obscurité. La fluorescence du rouge de Nil ainsi que l'autofluorescence de la chlorophylle ont été enregistrées après excitation à 488 nm. La zone d'acquisition du rouge de Nil est comprise entre 579 et 641 nm et 650 et 700 nm pour la chlorophylle. Des images Bright field ont été également acquises en parallèle.

7.3. Microscopie électronique à transmission

Les observations de cellules entières de *Phaeodactylum tricornutum* ont été réalisées à une phase logarithmique tardive ($2 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹) avant le décalage de la période de lumière, après centrifugation à 5000 x g à 4 ° C pendant 10 minutes. Les cellules ont été fixées dans du glutaraldéhyde 2,5% (TAAB, Aldermaston, Angleterre) ; formaldéhyde 2% (Polysciences, Hirschberg an der Bergstrasse, Allemagne) ; cacodylate 0,1 M (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), pH 7,4, pendant 1 heure à température ambiante. L'observation au microscope électronique a été réalisée en utilisant un microscope à double faisceau Zeiss NVision 40 tel que décrit précédemment (Flori et al., 2016).

Afin de vérifier la pureté des échantillons de gouttelettes lipidiques, des observations de fractions purifiées ont été réalisées après un marquage avec une coloration négative. Les gouttelettes lipidiques sont déposées sur des grilles de microscopie électronique enduites de carbone et rendu hydrophile par décharges lumineuses (*glow-discharged*). Après quelques minutes, le liquide en excès est retiré avec du papier filtre et, avant séchage, la préparation est colorée négativement avec 2% (p/v) d'acétate d'uranyle. L'excès de colorant est retiré par capillarité avec un papier filtre et l'échantillon est laissé à sécher. Les images

Matériel & Méthodes

sont enregistrées à l'aide d'un microscope Philips-FEI CM200 fonctionnant à 200 kV équipé d'un appareil photo numérique TVIPS TemCam F216 (Jean Luc Putaux, Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Grenoble, France).

8. Analyses statistiques

Les expériences ont été réalisées en triplicats biologiques. Les résultats ont été analysés avec le logiciel GraphPad Prism version 6.07. Des tests t ainsi que des ANOVA à un et deux facteurs ont été réalisés. La différence entre deux groupes a été considérée comme significative lorsque la p-value était égale ou inférieure à 0,05.

Résultats

Chapitre 1:
Induction de la synthèse de
gouttelettes lipidiques par des petites
molécules chez *Phaeodactylum*
tricornutum

1. Préambule

La recherche appliquée s'intéresse aux microalgues pour leur potentiel d'accumulation de TAGs dans des conditions de stress environnementaux (carence nutritionnelle en azote par exemple) sous forme de gouttelettes lipidiques (Abida et al., 2015). Ces molécules de TAG présentent un intérêt biotechnologique pour des applications allant de la nutrition au secteur biomédical, passant par la cosmétique, la chimie verte et les biocarburants (Lupette & Maréchal, 2018). Cependant, ces carences nutritionnelles provoquent un arrêt de la croissance limitant le rendement global en huile. Il convient donc de rechercher des approches alternatives et d'avancer nos connaissances sur les mécanismes d'induction de la formation des gouttelettes. La génétique chimique repose sur l'altération de phénotypes par des petites molécules (Maréchal et al., 2011). Il est en particulier possible d'utiliser des petites molécules pour identifier des processus biologiques inconnus chez de nombreux modèles d'études en choisissant bien la chimiothèque à cribler (Hibert, 2011). Les petites molécules sont considérées comme « druggable » (aptées à être biodisponibles et bioactives) suivant la règle empirique de Lipinski (Lipinski et al., 2001, Lipinski, 2004), *i.e.* une masse moléculaire inférieure à 500 Daltons, un nombre de liaisons donneuses d'hydrogène inférieur à 5 (nombre total de liaisons azote-hydrogène ou oxygène-hydrogène), un nombre de liaisons acceptrices d'hydrogène inférieur à 10 (l'ensemble des atomes d'azote et d'oxygène) et un coefficient de partage octanol-eau (log P) inférieur à 5 (Leo et al., 1971). A partir de ces règles, de nombreuses banques de petites molécules, de taille variable, ont été développées à travers le monde (Waze et al., 2018).

Dans le cadre des travaux présentés dans l'article 1, nous avons utilisé la collection commerciale Prestwick (<http://www.prestwickchemical.com/libraries-screening-libraries>) pour identifier des processus ou des voies métaboliques. Cette chimiothèque, composée de 1200 molécules, a été biologiquement annotée et comprend des médicaments qui ont été approuvés, dans le passé, par l'agence américaine des produits alimentaires et des médicaments (US-FDA). L'hypothèse sous-jacente est celle d'un mimétisme entre les petites molécules de la collection et des molécules impliquées dans des processus de signalisation *in vivo*, ou encore des métabolites. Le criblage de petites molécules de l'article 1 a été réalisé pour identifier des composés pouvant favoriser l'accumulation de TAG chez *Phaeodactylum* avec un impact minimal sur la croissance cellulaire. Ce criblage a été réalisé par Mélissa Conte (Laboratoire PCV) et Caroline Barette au sein de la plateforme de Criblage pour des Molécules BioActives (CMBA - CEA Grenoble).

L'article 1 présente tout d'abord une méthode de détection multi-paramétrique permettant la réalisation du criblage. Le criblage a permis l'identification de 34 molécules favorisant

l'accumulation de TAG chez *Phaeodactylum*. Il a été montré précédemment que ces molécules ciblaient notamment des récepteurs et des transporteurs membranaires, la biosynthèse des acides nucléiques, la division cellulaire, le métabolisme des stéroïdes, des enzymes ainsi que des voies de signalisation (nucléotides cycliques et oxylipines). Les travaux présentés dans l'article 1 se sont ensuite focalisés sur 5 composés issus du criblage (Antimycine A, Nocodazole, 17 α -éthynylestradiol, Mevastatin et Allopurinol) pour une étude dose-réponse.

Nous avons approfondi l'étude de l'effet du 17 α -éthynylestradiol par une approche lipidomique et transcriptomique. L'analyse lipidomique révèle une forte accumulation de TAG, une augmentation de la PC et une diminution modérée du MGDG, modifiant la balance MGDG/PC en présence de 17 α -éthynylestradiol. L'analyse transcriptomique révèle une augmentation de l'expression de gènes favorisant l'accumulation d'acétyl-CoA. Le criblage de petites molécules a permis de mettre en évidence un nombre important d'antagonistes de la voie de synthèse des stéroïdes suggérant que les voies de production des stéroïdes et des TAGs étaient en compétition vis-à-vis du carbone, provenant en particulier de l'acétyl-CoA.

L'analyse du lipidome montre également qu'un traitement avec le 17 α -éthynylestradiol modifie la voie de synthèse des acides gras polyinsaturés à longues chaînes (VLC-PUFAs), notamment le C20:5 (EPA) dont la teneur baisse dans l'ensemble des classes lipidiques à l'exception du SQDG. Cette altération s'effectue notamment au niveau de deux glycérolipides : la PC et le DGTA, confirmant que ces lipides sont des plateformes de synthèse de l'EPA vraisemblablement localisées au niveau du réticulum endoplasmique (Abida et al., 2015).

2. Article 1

Article 1 : Conte, M., **Lupette, J.**, Seddiki, K., Meï, C., Dolch, L.J., Gros, V., Barette, C., Rébeillé, F., Jouhet, J., Maréchal, E. 2018. Screening of biologically annotated drugs triggering triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum*. ***Plant Physiology***. 177: 532-552.

N.B: La numérotation des figures est ici indépendante du manuscrit de thèse.

Screening for Biologically Annotated Drugs That Trigger Triacylglycerol Accumulation in the Diatom *Phaeodactylum*¹

Melissa Conte,^a Josselin Lupette,^a Khawla Seddiki,^a Coline Meï,^a Lina-Juana Dolch,^a Valérie Gros,^a Caroline Barette,^b Fabrice Rébeillé,^a Juliette Jouhet,^a and Eric Maréchal^{1,2}

^aLaboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Centre National de la Recherche Scientifique, Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Grenoble Alpes, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, Commissariat à l'Énergie Atomique-Grenoble, 38000 Grenoble, France

^bLaboratoire de Biologie à Grande Echelle, Commissariat à l'Énergie Atomique, INSERM, Université Grenoble Alpes, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, Commissariat à l'Énergie Atomique-Grenoble, 38000 Grenoble, France

ORCID IDs: 0000-0002-7842-575X (J.L.); 0000-0002-6082-4613 (V.G.); 0000-0003-0999-7751 (C.B.); 0000-0002-0060-1696 (E.M.).

Microalgae are a promising feedstock for the production of triacylglycerol (TAG) for a variety of potential applications, ranging from food and human health to biofuels and green chemistry. However, obtaining high TAG yields is challenging. A phenotypic assay for the accumulation of oil droplets was developed to screen a library of 1,200 drugs, annotated with pharmacology information, to select compounds that trigger TAG accumulation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Using this screen, we identified 34 molecules acting in a dose-dependent manner. Previously characterized targets of these compounds include cell division and cell signaling effectors, membrane receptors and transporters, and sterol metabolism. Among the five compounds possibly acting on sterol metabolism, we focused our study on ethynylestradiol, a synthetic form of estrogen that is used in contraceptive pills and known for its ecological impact as an endocrine disruptor. Ethynylestradiol impaired the production of very-long-chain polyunsaturated fatty acids, destabilized the galactolipid versus phospholipid balance, and triggered the recycling of fatty acids from membrane lipids to TAG. The *P. tricorutum* transcriptomic response to treatment with ethynylestradiol was consistent with the reallocation of carbon from sterols to acetyl-coenzyme A and TAG. The mode of action and catabolism of ethynylestradiol are unknown but might involve several up-regulated cytochrome P450 proteins. A fatty acid elongase, $\Delta 6$ -ELO-B1, might be involved in the impairment of very-long-chain polyunsaturated fatty acids and fatty acid turnover. This phenotypic screen opens new perspectives for the exploration of novel bioactive molecules, potential target genes, and pathways controlling TAG biosynthesis. It also unraveled the sensitivity of diatoms to endocrine disruptors, highlighting an impact of anthropogenic pollution on phytoplankton.

Photosynthetic algae are promising systems for the development of cell factories, since they are able to capture CO₂ and produce valuable biomolecules such

as triacylglycerols (TAGs). Oils made of TAGs have a broad range of applications, from feed, food, and health to commodity products complementing fossil hydrocarbons and chemistry (Lupette and Maréchal, 2018). TAGs contain three fatty acids (FAs) esterified to a glycerol backbone, and they accumulate inside cells in the form of lipid droplets (Maeda et al., 2017). The potentiality of algal oil lies in the molecular variety of FAs esterified to TAGs, with chain lengths ranging from ~14 to ~22 carbons and harboring from zero to six double bonds (Dolch and Maréchal, 2015). Some examples of FAs are palmitic acid (16:0, with 16 carbons and no double bond), oleic acid (18:1), linolenic acid (18:3), eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5), etc. Very-long-chain polyunsaturated fatty acids (VLC-PUFAs) like EPA have a higher added value for food or health applications than shorter chained and less saturated FAs, such as 16:0, which makes them usable for biofuel applications (Lupette and Maréchal, 2018). Increasing the productivity and quality of alga-based oil are critical bottlenecks that need to be overcome (Pulz and

¹ This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (DiaDomOil), Commissariat à l'Énergie Atomique (Irtelis and Flagship PhD grant programs), and Agence Nationale de la Recherche Programme Investissement d'Avenir (Océanomics).

² Address correspondence to eric.marechal@cea.fr.

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

M.C. performed most of the screening experiments; J.L., M.C., and L.-J.D. contributed to dose-response studies and phenotypic analyses; J.L., K.S., and E.M. contributed to whole-genome transcriptomic analyses; V.G. provided technical assistance for lipidomic profiling; F.R. and J.J. provided specific expertise in glycerolipid analyses; C.B. provided specific expertise and technical assistance for phenotypic screens; E.M. conceived the project; all the authors contributed to the writing of the article.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.17.01804

Gross, 2004; Spolaore et al., 2006; Chisti, 2013; Klein-Marcuschamer et al., 2013; Ruiz et al., 2016; Arbenz et al., 2018).

The biodiversity of algae occupies very distant branches of the tree of life (Brodie et al., 2017), ranging from prokaryotes (i.e. cyanobacteria) to a multitude of eukaryote lineages that arose from a primary endosymbiosis, such as unicellular green algae, or from a secondary endosymbiosis, such as diatoms (Bozarth et al., 2009; Levitan et al., 2014). Important eukaryotic models with well-annotated genomes, transformation techniques, and molecular tools for genetic engineering are being developed, like *Chlamydomonas reinhardtii* for green algae (Merchant et al., 2007; Scaife and Smith, 2016), *Phaeodactylum tricorutum* for diatoms (Falciatore et al., 1999; Siaut et al., 2007; Bowler et al., 2008; De Riso et al., 2009; Daboussi et al., 2014; Nymark et al., 2016), and *Nannochloropsis* spp. for eustigmatophytes (Kilian et al., 2011; Anandarajah et al., 2012; Vieler et al., 2012; Corteggiani Carpinelli et al., 2014). The secondary endosymbionts arose from a complex evolutionary history (McFadden, 1999; Stoebe and Maier, 2002; Kutschera and Niklas, 2005; Gould et al., 2008; Keeling, 2009; Botté and Marechal, 2014; Petroutsos et al., 2014; Brodie et al., 2017); their subcellular ultrastructure is extremely sophisticated (Flori et al., 2016), and the annotation of their genome highlights a large proportion of proteins of unknown function compared with other eukaryotes originating from a primary endosymbiosis (Maier et al., 2000; Gardner et al., 2002; Armbrust et al., 2004; Bowler et al., 2008; Deschamps and Moreira, 2012). Species such as *P. tricorutum* and *Nannochloropsis* spp. have cultivation and oil productivity performances suitable for the development of production strains for industrial processes (d'Ippolito et al., 2015; Ajjawi et al., 2017; Wang and Seibert, 2017). Some genetic engineering approaches require robust prior knowledge regarding the functions of genes or pathways that might be modified in an attempt to drive carbon flux toward TAG production (Liao et al., 2016; Brodie et al., 2017). We need to advance our knowledge of the specific subcellular compartmentalization of secondary endosymbionts, cell growth and development, photosynthetic efficiency, CO₂ capture, carbon partitioning, glycerolipid metabolism, etc., so as to develop strains and processes with higher biomass yields, TAG productivity, and controlled FA contents.

Phenotypic screens involving large collections of compounds (or chemolibraries) have been used successfully to identify molecules that could trigger the accumulation of TAG in various microalgae strains, such as the green algae *C. reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, and *Tetrachlorella alterens* (Wase et al., 2017), and secondary endosymbionts, such as *Nannochloropsis* spp. and *P. tricorutum* (Franz et al., 2013). Having an active molecule in hand, it is then possible to search for the protein target(s) that could be used to develop a genetically engineered strain, modified in the targeted pathway (Mayer et al., 1999; Haggarty et al., 2000; Maréchal, 2008, 2009); however, this molecule-to-target

approach is time consuming and uncertain. Some phenotypic screens have allowed the identification of compounds possibly triggering TAG accumulation in diatoms, but with little information on the putative targets that could be impaired by the active compounds (Franz et al., 2013). Here, we describe the screening of a biologically annotated chemolibrary containing drugs previously approved for safety by the U.S. Food and Drug Administration for at least one indication or used in clinical trials with bioavailability, pharmacology, and toxicity information (Prestwick Chemical Library; 1,200 compounds). The screen was developed to select molecules that trigger the accumulation of TAG within *P. tricorutum* living cells. Theoretically, hit molecules from this repurpose collection should interact with *P. tricorutum* proteins that share some structural and/or functional features with the original drug targets (Blagosklonny, 2003; Jeong et al., 2015; Coleman et al., 2016). Our objective was then to identify biological processes or pathways affected by the active molecules and propose lines of research for future *P. tricorutum* strain developments.

RESULTS

Setup of Screening Conditions and Statistical Robustness of the Selected Multiparametric Assay

Our objective was to define a multiparametric assay that allows the robust measurement of cell concentrations, TAG levels, and ideally other parameters that would allow the monitoring of the physiological status of cells. We first optimized culture conditions for *P. tricorutum* in different multiwell plate systems. We sought a compromise between the miniaturization of the incubation volume, so as to add the smallest possible amounts of compounds per well, and the decreased capacity of liquids to be mixed in such small volumes, even with permanent shaking. After *P. tricorutum* CCMP632/CCAP 1055/1 wild-type cells were dispensed in 48- or 96-well plates, we observed an excess of cells adhering to the plastic sides in the 96-well plates. In 48-well plates, the addition of 4-mm glass beads helped limit cell adhesion, aided mixing, and allowed us to measure growth and TAG accumulation after 48-h incubations.

We compared different methods to monitor cell abundance with sufficient high-throughput and statistical robustness. The easiest method would be by deducing cell abundance from light absorbance. We compiled data obtained from 140 independent data points using *P. tricorutum* cultures grown in plates or in flasks in enriched seawater/artificial water (ESAW) containing or lacking nitrogen (ESAW 1N1P or 0N1P, respectively). Cell concentrations were evaluated using a Malassez counting chamber. In this compiled data set, we detected a linear correlation between cell concentrations and A_{730} with the following equation: $y = 1.834.1^{-8}.x + 0.03758$ (where y is the number of cells and x is the absorbance, with a correlation coefficient of 0.9637; Supplemental Fig. S1).

Unfortunately, in the conditions used for the screening, the dynamic range (the difference between the highest and lowest values) was not sufficient. We tried to develop 4',6-diamidino-2-phenylindole or Hoechst staining methods based on the binding of these dyes to nuclear DNA, but the background was too strong to allow a statistically relevant determination of cell abundance. Eventually, we used a strain expressing a Histone H4 fused to Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) at the N terminus (Siaut et al., 2007). Using a calibrated culture with known cell concentrations, the measurement of YFP fluorescence allowed us to evaluate cell abundance with a linear correlation coefficient of 0.97 (Fig. 1A). This correlation is valid from 0.1 to 0.55 mM NaNO₃. In the same plates, it was also possible to detect the fluorescence of chlorophylls and of Nile Red, a dye that binds to lipid droplets (Fig. 1, B and C), within a linear range based on positive and negative cell controls (i.e. cells incubated for 48 h in the absence or presence of nitrogen).

A statistical analysis classically used to determine the suitability of an assay is the Z' factor (Zhang et al., 1999) derived from measurements obtained with positive and negative controls. Using our selected assay conditions and after 48-h incubations, a series of low-TAG and high-TAG control cells were analyzed: 17 wells containing cells grown in 1N1P medium (3.3×10^6 cells mL⁻¹) and 17 wells containing cells grown in 0N1P medium (1.6×10^6 cells mL⁻¹), respectively (Supplemental Fig. S2). Based on our results, a Z' factor was calculated for each parameter: 0.75 for cell abundance measurements (based on YFP fluorescence), 0.64 for TAG content (based on Nile Red fluorescence), and 0.73 for chlorophyll level. These Z' factors being greater than 0.5, this indicated that the different conditions established during assay optimization led to an accurate standardized assay, suitable for screening the chemical library.

Primary and Secondary Screens to Identify Molecules Triggering TAG Accumulation in *P. tricornutum*

The screening of the Prestwick Chemical Library (1,200 compounds) was performed at a final concentration of 10 μM and 0.5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) using the automated multimodule platform from the Centre de Criblage pour des Molecules Bioactives in Grenoble, France. Thirty plates could be analyzed per week. Combined data are shown in Figure 2.

Two main criteria were used to select compounds for a secondary screen. The first criterion was a low impact on cell growth, viability, and chlorophyll level. Chlorophyll fluorescence level correlated linearly with cell abundance, with a correlation coefficient of 0.8189 (Fig. 3A). About 20% of the compounds were lethal to *P. tricornutum* at 10 μM, with YFP fluorescence lower than 10% of that of the control. Some compounds had apparently no impact on cell abundance but led to a

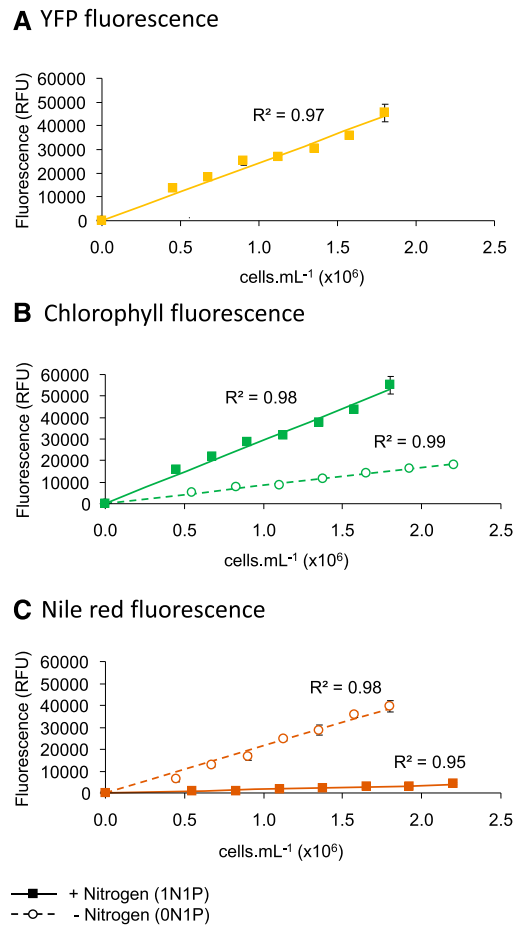


Figure 1. Calibration of the multiparametric assay for the phenotypic screen. The assay was developed using a strain expressing a Histone H4 protein fused to EYFP at the N terminus. Graphs show the correlations between measured fluorescence and cell concentrations after a 48-h incubation in ESW 1N1P and 0N1P media, respectively. A, Cell abundance. The YFP fluorescence was used to evaluate cell abundance in a calibrated population grown in 1N1P medium by measuring the excitation/emission fluorescence at 515/530 nm. B, Chlorophyll fluorescence. The fluorescence of chlorophyll was used as a basic evaluation of cell physiological status by measuring the excitation/emission fluorescence at 440/680 nm. C, Nile Red fluorescence. The content in TAG was evaluated by staining with Nile Red and measuring the fluorescence at 530/580 nm. Data correspond to biological triplicates \pm SD. Correlation coefficients were 0.94 or less. Solid squares represent cells grown in 1N1P medium (+ Nitrogen), and circles represent cells grown in 0N1P medium (– Nitrogen). RFU, Relative fluorescence units.

strong decrease of chlorophyll, below 50% of the control level. These compounds were not considered further. The second criterion was an increase in TAG level. A total of 160 compounds leading to an increase in Nile Red staining above 120% of the average per plate, while maintaining a cell abundance above 50% of the control (Fig. 3B), were then selected.

A secondary screen of the 160 compounds consisted of a reevaluation of their effect at 10 μM, in the same

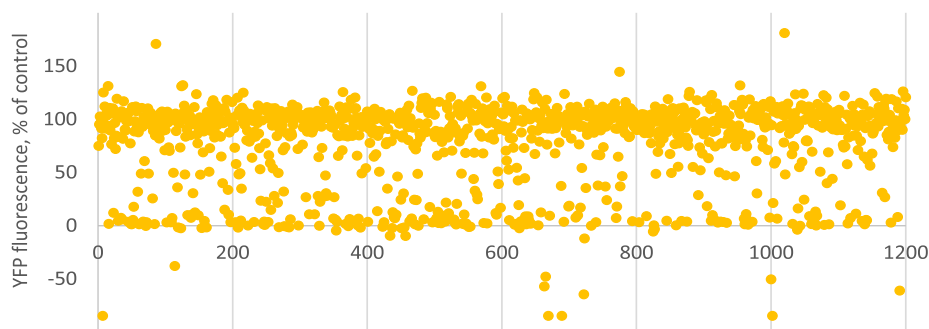
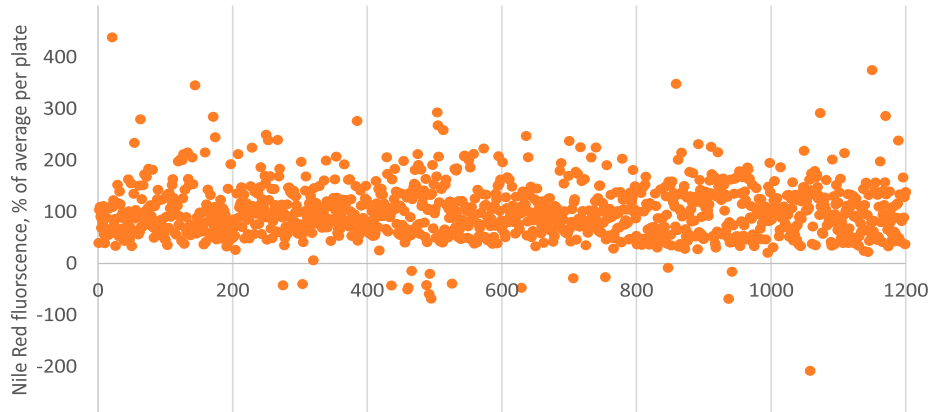
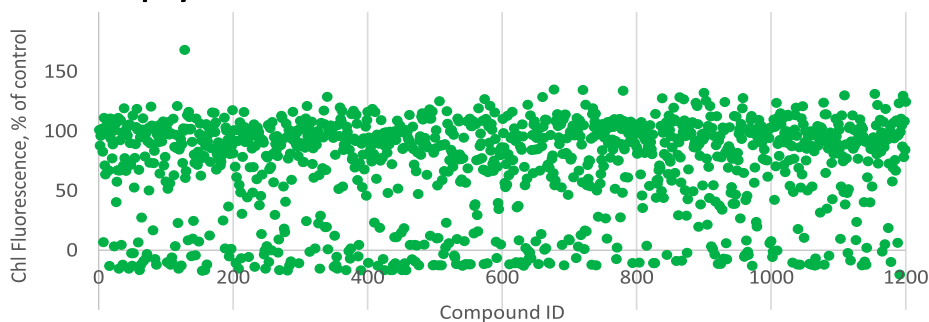
A Cell abundance**B TAG levels****C Chlorophyll levels**

Figure 2. Multiparametric screen of the Prestwick Chemical Library. Using the developed assay, *P. tricornutum* cells were incubated for 48 h with compounds of the Prestwick Chemical Library at a final concentration of 10 μM in 0.5% (v/v) DMSO. Multiple parameters were then measured as described in “Materials and Methods.” A, Cell abundance. The concentration of cells was estimated using a strain expressing a Histone H4 protein fused to EYFP based on the fluorescence at 515/530 nm. B, TAG levels. The content of TAG was evaluated by staining with Nile Red and measuring the fluorescence at 530/580 nm. C, Chlorophyll levels. The fluorescence of chlorophyll was measured at 440/680 nm.

conditions and in technical duplicates, so as to discard false positives and rank the compounds (Fig. 3C). We then tested 40 compounds in independent biological triplicates; this resulted in 34 hit molecules showing an increase in Nile Red staining higher than 120% (and up to 385%; Table I).

Previously characterized targets of the selected compounds were classified based on general biological function and/or molecular features and highlighted seven major categories of targets: (1) nucleic acid biosynthesis and cell division (pentamidine, oxytetracycline, ifosfamide, rifaximin, and nocodazole); (2) membrane receptors (xylometazoline, labetalol, acebutolol, meclizine, serotonin, alverin, pirenperone, hyoscyamine, pipenzolate, mecamlamine, buphenium, and dimaprit); (3) membrane transporters (bendroflumethiazide,

rimantadine, gaboxadol, and antimycin A); (4) sterol metabolism (estrone, ethynylestradiol, mevastatin, simvastatin, and ketoconazole); (5) cyclic nucleotide signaling (zardaverine and trapidil); (6) oxylipin signaling (meloxicam, azapropazone, and misoprostol); and (7) unrelated enzymes involved in carbohydrate metabolism, purine catabolism, and/or β -lactam drug resistance (miglitol, flucloxacillin, sulbactam, and allopurinol; Table I). In addition, we examined possible side effects on secondary targets and noticed that six compounds could have pleiotropic effects and act on cytochrome P450 enzymes involved in sterol metabolism (Table I).

Only five compounds triggered an increase in Nile Red staining in all independent biological triplicates and with an apparent low toxicity, nocodazole, antimycin A, ethynylestradiol, mevastatin, and allopurinol.

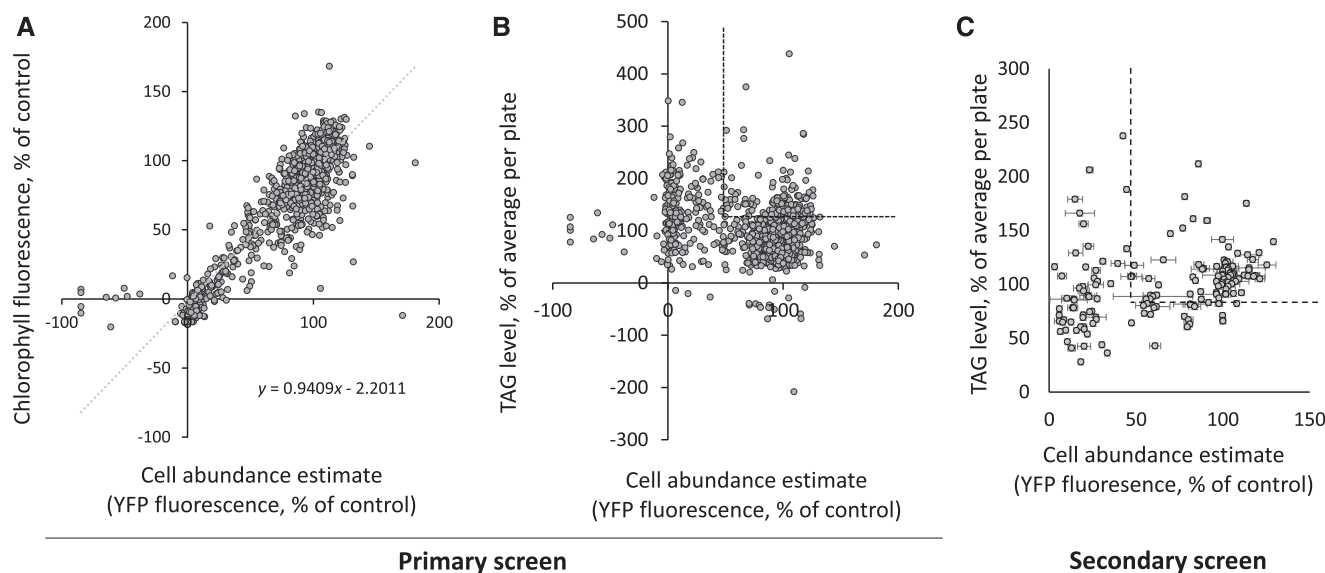


Figure 3. Selection of compounds based on primary and secondary screens. Based on the primary screen, two criteria were used to select compounds for the secondary screen: (1) low impact on cell abundance and/or chlorophyll level and (2) increase of Nile Red staining level. A, Primary screen, correlation between chlorophyll level and cell abundance detection. Values obtained from chlorophyll fluorescence levels and cell abundance based on YFP fluorescence were plotted. Linear correlation is given by the formula $y = 0.9409x - 2.2011$ ($R^2 = 0.8189$). B, Primary screen, comparison of Nile Red staining and cell abundance. The dashed line shows spots corresponding to compounds increasing Nile Red staining above 120% of the average per plate while maintaining a cell abundance above 50% of that of the control. C, Secondary screen. Parallel assays were repeated at $10 \mu\text{M}$ in technical duplicates, using 160 compounds selected following the primary screen. The dashed line shows spots corresponding to compounds increasing Nile Red staining above 120% of the average per plate while maintaining a cell abundance above 50% of that of the control. Error bars indicate SD.

Dose-Response Analyses of Hit Molecules Triggering TAG Accumulation in *P. tricornutum*

Focusing on the five molecules selected following primary and secondary screens, we performed a tertiary test consisting of dose-response analyses, in triplicate, at compound concentrations of 1.5, 3, 6, 12, 25, 50, and $100 \mu\text{M}$ (Fig. 4). The first striking observation is that, besides nocodazole, the selected molecules appeared to impair growth at high concentrations, above 25 to $50 \mu\text{M}$, based on cell abundance measured via the fluorescence of Histone H4 fused to EYFP. In these conditions, half-maximal inhibitory concentrations are ~ 30 , ~ 20 , ~ 10 , and greater than $100 \mu\text{M}$ for antimycin A, ethynylestradiol, mevastatin, and allopurinol, respectively. Three compounds triggered a proportional increase in TAG per cell in the tested range (antimycin A, ethynylestradiol, and allopurinol), with half-maximal effective concentrations of $\sim 50 \mu\text{M}$, whereas the increase in Nile Red fluorescence observed with mevastatin and nocodazole reached a limit at $50 \mu\text{M}$, with half-maximal effective concentration values of ~ 10 and $\sim 25 \mu\text{M}$, respectively.

This dose-response analysis supports the activity of selected compounds triggering TAG accumulation in *P. tricornutum*, likely via the interference of mitochondria and/or the chloroplast electron transport chain (antimycin A), microtubule dynamics (nocodazole), sterol metabolism (ethynylestradiol and mevastatin), and

purine catabolism (allopurinol). The effect of nocodazole, although appearing as very promising, decreased after longer incubations (up to 7 d), suggesting possible degradation of this compound by the diatom. In the following experiments, compound concentrations were adjusted as a compromise between the desired effects on TAG accumulation and the adverse impact on cell growth.

Chemical Interference of Sterol Metabolism

The screen highlighted compounds potentially targeting enzymes of the mevalonate pathway and sterol metabolism from the most upstream enzymes, such as the hydroxymethylglutaryl (HMG)-CoA reductase hit by simvastatin and mevastatin, to downstream enzymatic activities, such as a sterol 14α -demethylase affected by ketoconazole. This latter compound proved to be toxic at concentrations higher than $30 \mu\text{M}$. We analyzed additional molecules known to interfere with this pathway (Fig. 5). The biosynthesis of isopentenyl pyrophosphate and farnesyl pyrophosphate is common to all isoprenoids, whereas the biosynthesis of squalene is specific to sterol biosynthesis. Risedronate, known to inhibit farnesyl pyrophosphate synthase (Bergstrom et al., 2000), triggered an increase in TAG when provided at concentrations higher than $30 \mu\text{M}$. We confirmed that Ro48-8071, an oxidosqualene cyclase

Table 1. Compounds selected after the secondary screen

Chemical Abstracts Service (CAS) numbers are indicated. Results of the three independent dose-response analyses are compiled, with high Nile Red (NR) dose-dependent detection and toxicity. Previously characterized targets of the selected compounds are classified based on general biological function and/or molecular features.

Chemical Name	CAS No.	Tertiary Screen Results (Triplicate) and Toxicity (*) in the Tested Concentration Range	Previously Characterized Targets	Known Side Activities on Cytochrome P450 (CYP) Involved in Sterol Metabolism	References
Nucleic acid biosynthesis and cell division					
Pentamidine	140-64-7	High NR in two of three tests	Nucleic acid-binding activity		Overington et al. (2006)
Oxytetracycline	6153-64-6	High NR in two of three tests	Nucleic acid-binding activity		Overington et al. (2006)
Iloflamide	3778-73-2	High NR in two of three tests	Alkylation of DNA	CYP2B6 (steroid hydroxylase) modulator	Furlanut and Franceschi (2003); Chen et al. (2005)
Rifaximin	80621-81-4	High NR in two of three tests	RNA polymerase-blocking agent		Overington et al. (2006)
Nocodazole	31430-18-9	High NR in three of three tests (>120%)	Microtubule-depolymerizing agent		Baas et al. (2016)
Membrane receptors					
Xylometazoline	1218-35-5	High NR in three of three tests (>120%; *)	Adrenergic receptor agonist		Haenisch et al. (2010)
Labetalol	32780-64-6	High NR in two of three tests	Adrenergic receptor agonist	CYP2D6 (steroid hydroxylase) inhibitor	Riva et al. (1991); Preissner et al. (2010)
Acebutolol	34381-68-5	High NR in two of three tests	Adrenergic receptor agonist	CYP2D6 (steroid hydroxylase) inhibitor	van den Meiracker et al. (1988); Preissner et al. (2010)
Meclozine	1104-22-9	High NR in two of three tests	Dopamine (precursor of adrenaline) antagonist		Haraguchi et al. (1997)
Serotonin	153-98-0	High NR in two of three tests	Serotonin receptor ligand		Pytlak et al. (2011)
Alverine	5560-59-8	High NR in three of three tests (>120%; *)	Serotonin receptor antagonist		Coelho et al. (2001)
Piperone	75444-65-4	High NR in two of three tests	Serotonin receptor antagonist		Pawlowski et al. (1985)
Hyoscyamine	101-31-5	High NR in two of three tests	Acetylcholine receptor antagonist		Huang et al. (1998)
Pipenzolate	125-51-9	High NR in two of three tests	Acetylcholine receptor antagonist		Attwood (1976)
Mecamylamine	826-39-1	High NR in two of three tests	Acetylcholine receptor antagonist		Overington et al. (2006)
Bephenium	3818-50-6	High NR in two of three tests	Acetylcholine receptor antagonist		Qian et al. (2006)
Dimaprit	23256-33-9	High NR in two of three tests	Histamine [2-(1H-imidazol-4-yl)ethanamine] H2 receptor antagonist		Shteinikov et al. (2017)
Membrane transporters					
Bendroflumethiazide	73-48-3	High NR in two of three tests	Solute carrier family 12 member 3 inhibitor/carbonic anhydrase inhibitor		Chen et al. (2002); Tricarico et al. (2006)
Rimantadine	13392-28-4	High NR in three of three tests (>120%; *)	Proton pump inhibitor		Imming et al. (2006)
Gaboxadol	64603-91-4		Proton-coupled amino acid transporter		Larsen et al. (2010)
Antimycin A	1397-94-0	High NR in three of three tests (>120%)	Mitochondria or chloroplast electron transport chains		Shikanai (2014); Georgakopoulos et al. (2017)
Sterol metabolism					

(Table continues on following page.)

Table 1. (Continued from previous page.)

Chemical Name	CAS No.	Tertiary Screen Results (Triplicate) and Toxicity (*) in the Tested Concentration Range	Previously Characterized Targets	Known Side Activities on Cytochrome P450 (CYP) Involved in Sterol Metabolism	References
Estrone	53-16-7	High NR in two of three tests	CYP2B6 (steroid hydroxylase) substrate		Preissner et al. (2010)
Ethinylestradiol	57-63-6	High NR in three of three tests (>120%)	CYP2C8 (steroid hydroxylase) inhibitor		Walsky et al. (2005)
Mevastatin	73573-88-3	High NR in three of three tests (>120%)	HMG-CoA reductase	CYP2C8 (steroid hydroxylase) inhibitor	Chen et al. (2002); Tornio et al. (2005)
Simvastatin	79902-63-9	High NR in three of three tests (>120%; *)	HMG-CoA reductase	CYP2C8 (steroid hydroxylase) inhibitor	Liu et al. (2003); Tornio et al. (2005)
Ketoconazole	65277-42-1	High NR in two of three tests	CYP (sterol 14- α -demethylase) inhibitor		Warrilow et al. (2010)
Cyclic nucleotide signaling					
Zardaverine	101975-10-4	High NR in two of three tests	Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor		Schudt et al. (1991)
Trapidil	15421-84-8	High NR in two of three tests	Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor		Somuncu et al. (2005)
Oxilipin signaling					
Meloxicam	71125-38-7	High NR in two of three tests	Prostanoid signaling modulator/cyclooxygenase COXII/prostaglandin-endoperoxide synthase inhibitor	CYP2C9 (steroid hydroxylase) inhibitor	Chesné et al. (1998); Panara et al. (1999)
Azapropazone	13539-59-8	High NR in two of three tests	Prostanoid signaling modulator/cyclooxygenase COXII/prostaglandin-endoperoxide synthase inhibitor		Priddy et al. (1990)
Misoprostol	59122-46-2	High NR in two of three tests	PG E1 analog/PG receptor agonist		Nataraj et al. (2001)
Enzymes (carbohydrate metabolism, purine catabolism, and/or β -lactam drug resistance)					
Miglitol	72432-03-2	High NR in two of three tests	α -Glycosidase inhibitor		Fukaya et al. (2009)
Flucloxacillin	1847-24-1	High NR in two of three tests	Penicillin (β -lactam drug)-binding protein (glycosyltransferase) inhibitor		Mainardi et al. (2008)
Sulbactam	68373-14-8	High NR in two of three tests	β -Lactamase inhibitor		Tofir et al. (2007)
Allopurinol	315-30-0	High NR in three of three tests (>120%)	Inhibition of xanthine (imidazole-derived heterocycle) oxidase		Pacher et al. (2006)

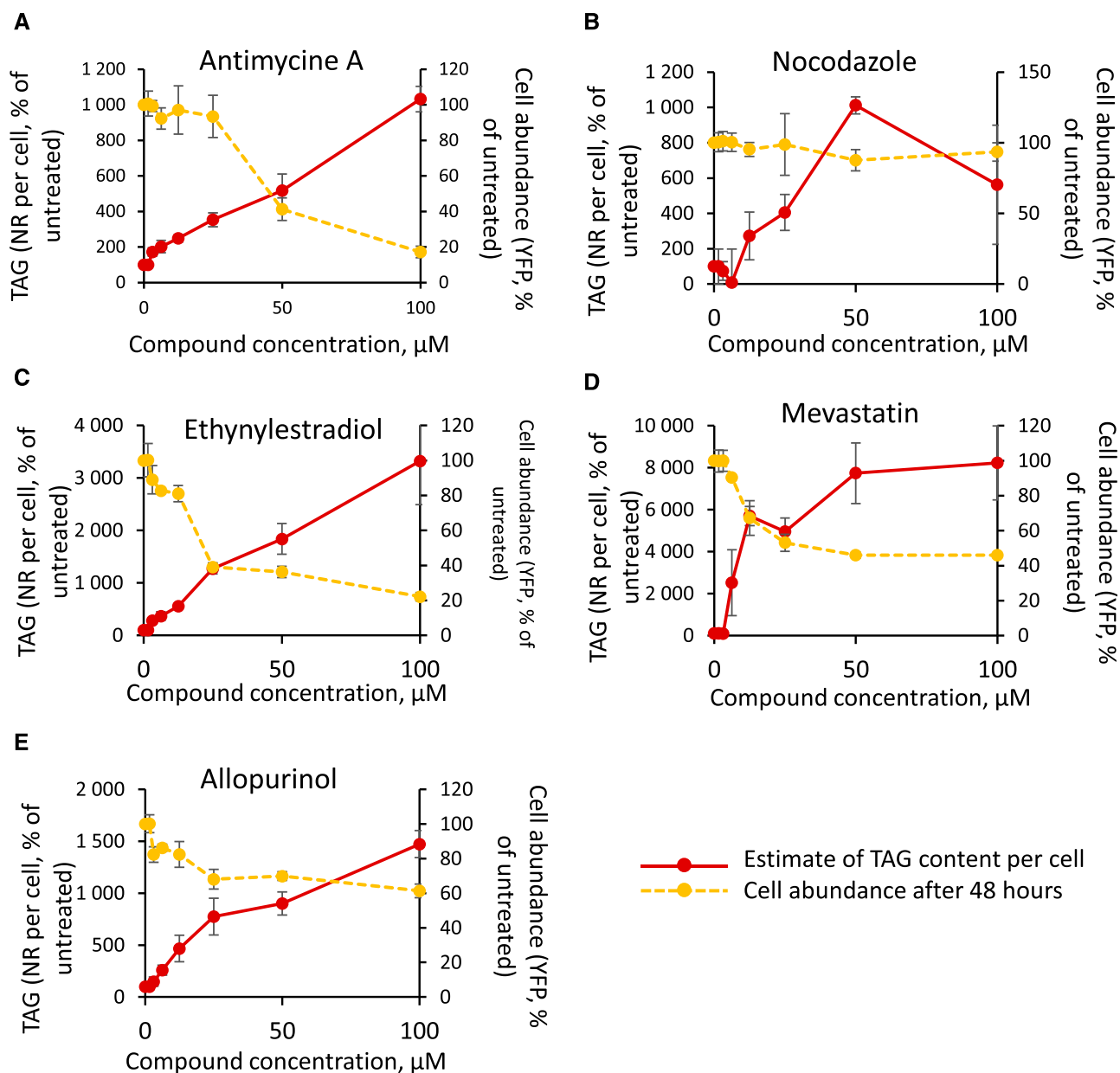


Figure 4. Dose-response analyses of secondary screen-selected compounds. Dose-response analyses were performed as described in “Materials and Methods,” in triplicate, at compound concentrations of 1.5, 3, 6, 12, 25, 50, and 100 μM . Cell abundance was evaluated based on the fluorescence of a Histone H4 protein fused to EYFP and expressed as a percentage of the untreated control (100% = YFP level at 0 μM compound). TAG accumulation was evaluated based on Nile Red staining, normalized by cell abundance, and expressed as a percentage of the untreated control (100% = Nile Red level per cell at 0 μM compound).

inhibitor, induced an accumulation of TAG, as described previously (Fabris et al., 2014). The accumulation of TAG was observed when Ro48-8071 was supplied at 3 μM , whereas above 30 μM , this compound was toxic. Figure 5 also shows the possible interference of cytochrome P450 oxidases/hydroxylases acting downstream in the sterol pathway, which could be inhibited by ethynylestradiol, ifosfamide, labetalol, acebutolol, and meloxicam (Table I). Following our

screening, the high proportion of inhibitors of sterol metabolism highlights that this pathway represents a strong competitive route, diverting acetyl-CoA from FAs and TAG. This proportion of sterol metabolism antagonists also could reflect a bias in the library of compounds we screened. Interestingly, although high concentrations of molecules impaired growth, lower concentrations triggered an increase in TAG with a low impact on cell proliferation.

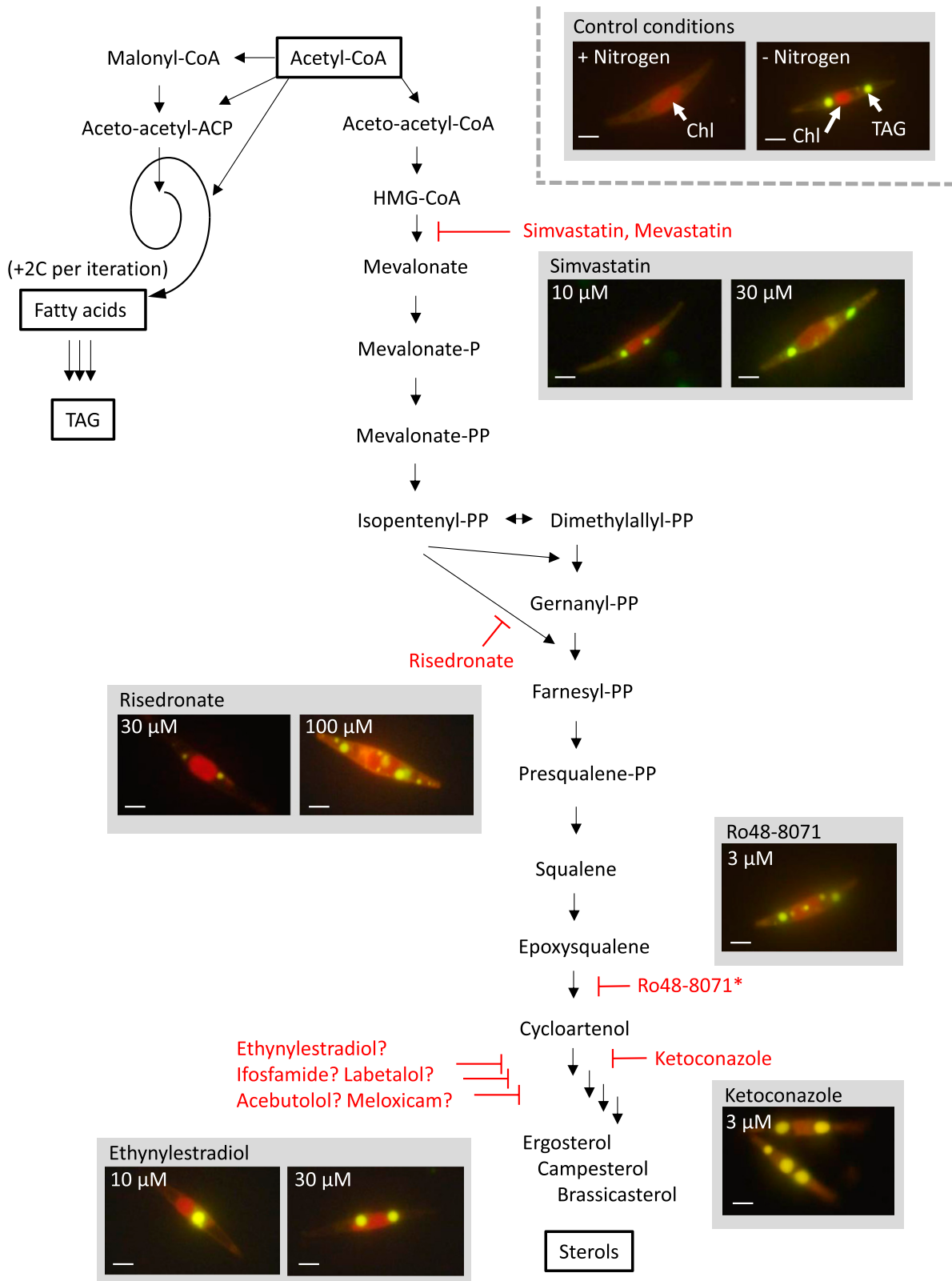


Figure 5. Compounds interfering with sterol metabolism. The pathway is adapted from Fabris et al. (2014). The biosynthesis of isopentenyl pyrophosphate (Isopentenyl-PP) and farnesyl pyrophosphate (Farnesyl-PP), which is common to all isoprenoids, is initiated by the reduction of HMG-CoA into mevalonate. Epoxysqualene is the last noncyclic intermediate in the pathway. The molecular diversity of sterols is then generated downstream of cycloartenol and involves cytochrome P450 cyclooxygenases. The

Lipidomic Remodeling and Physiological Response Induced by Ethynylestradiol

A previous genetic study demonstrated that the impairment of sterol metabolism following the down-regulation of one of its enzymes, oxidosqualene cyclase, led to an interruption of the sterol biosynthetic pathway and a strong increase in Nile Red fluorescence, suggesting an accumulation of TAG in *P. tricornutum* (Fabris et al., 2014). However, the precise remodeling of glycerolipids and its mechanism had not been analyzed. The increase in the proportion of TAG was not characterized, and it was not established whether all membrane glycerolipids were altered, regardless of their FA molecular species or their polar heads, or if a specific effect had occurred (Fabris et al., 2014).

We focused our analyses on ethynylestradiol (also named 17- α -ethynylestradiol; Inhoffen and Hohlweg, 1938), since this compound was effective at low concentrations, is supposed to act downstream in the pathway, and is one of the most soluble molecules we identified. Ethynylestradiol is a synthetic estrogen that could mimic potential analogs acting as natural hormones/pheromones/infochemicals. It is a derivative of estrone and is used in birth control pills based on its strong binding affinity to the human estrogen receptor (Jensen and DeSombre, 1973). This compound recently attracted increasing attention because both natural and synthetic estrogens are discharged in the environment by anthropogenic practices, including by humans and domestic animals (Aris et al., 2014; Adeel et al., 2017). Estrogens have demonstrated impacts on the aquatic environment, including a well-studied effect on sex determination in fish (Bhandari et al., 2015; Siegenthaler et al., 2017); however, the effects of these endocrine disruptors on phytoplankton have not been adequately investigated (Liu et al., 2010; Pocock and Falk, 2014).

First, we checked whether the estimate of cell abundance based on Histone H4-YFP fusion was accurate: we repeated the dose-dependent experiment, confirmed that Nile Red staining increased regularly with increasing doses of ethynylestradiol, and reevaluated cell numbers using a Malassez counting chamber (Supplemental Fig. S3), which confirmed that ethynylestradiol had a significant impact on growth at concentrations higher than 8 to 10 μM . The cells did not show any strong defect at the level of photosynthesis, based on PSII efficiency measured by the F_v/F_m ratio, besides a moderate decline above 30 μM (Supplemental

Fig. S3). The impact on growth could not be attributed to a transcriptional arrest of nucleotide synthesis (based on the transcriptomic responses of genes annotated in nucleotide biosynthesis that were unchanged [Phatr3_J25204], up-regulated [Phatr3_J14626 and Phatr3_J47067], or slightly down-regulated [Phatr3_EG02569]) or cell division (based on the transcriptomic responses of genes annotated in cell division processes, such as Cdc20 Phatr3_J12783 and APC8 Phatr3_J38886, which appear up-regulated, or CDH1 Phatr3_J2648, which showed no change in expression; Supplemental Table S1).

We then sought to confirm whether the increased Nile Red staining level corresponded to a significant change in TAG. To that purpose, we determined the glycerolipid profile of *P. tricornutum* cells grown in 400 mL of 1N1P medium with 0.5% (v/v) DMSO in the presence or absence of 30 μM ethynylestradiol and at a cell density of 1×10^6 cells mL^{-1} . After a 48-h incubation, glycerolipids were extracted and analyzed as described previously (Abida et al., 2015). Major polar glycerolipids consist of a glycerol backbone to which two FAs are linked by ester bonds and harboring a polar head. In *P. tricornutum*, chloroplast-specific classes comprise acylsulfoquinovosyldiacylglycerol, sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG), monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), digalactosyldiacylglycerol (DGDG), and phosphatidylglycerol (PG). Glycerolipids synthesized by the endoplasmic reticulum comprise phosphatidylcholine (PC) and diacylglycerylhydroxymethyl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanine (DGTA; Abida et al., 2015). Following the treatment with ethynylestradiol, a strong increase in TAG could be observed, confirming the increase in Nile Red staining (Fig. 6A, left). Polar lipids apparently were not strongly affected, besides a specific decrease in MGDG and an increase in PC. Interestingly, similar trends were observed after a treatment with 15 μM simvastatin, another molecule targeting sterol metabolism (Fig. 6A, right).

When analyzing FA profiles within each class of glycerolipids, striking differences could be observed. First, with the noticeable exception of SQDG, the proportion of EPA (20:5) decreased in all major lipid classes (i.e. MGDG, DGDG, PG, PC, and DGTA; Fig. 6B). The synthesis of this VLC-PUFA is still not completely elucidated, but it is now considered that it is elaborated from short-chain FAs, including saturated molecular species such as 16:0 (Dolch et al., 2017b), by a series of elongations and desaturations (Sayanova and Napier,

Figure 5. (Continued.)

connection with FA and TAG biosynthesis occurs at the level of acetyl-CoA. Sterol and TAG appear as competing sinks for carbon. FA synthesis is an iterative process adding two carbons (2C) per iteration, producing FAs of 16 or 18 carbons. FAs can be elongated further in the cytosol and are used for the biosynthesis of polar and storage glycerolipids, including TAG. Inhibitors are shown in red at the level of their primary enzymatic targets. ?, Putative inhibitors in the downstream part of sterol metabolism acting on cytochrome P450 enzymes; *, the Ro48-8071 effect was described previously by Fabris et al. (2014). Fluorescence imaging of treated wild-type cells highlights chlorophyll fluorescence (440/680 nm), allowing the detection of chloroplasts (Chl) and Nile Red staining (530/580 nm) of oil droplets enriched in TAG. Bars = 5 μm .

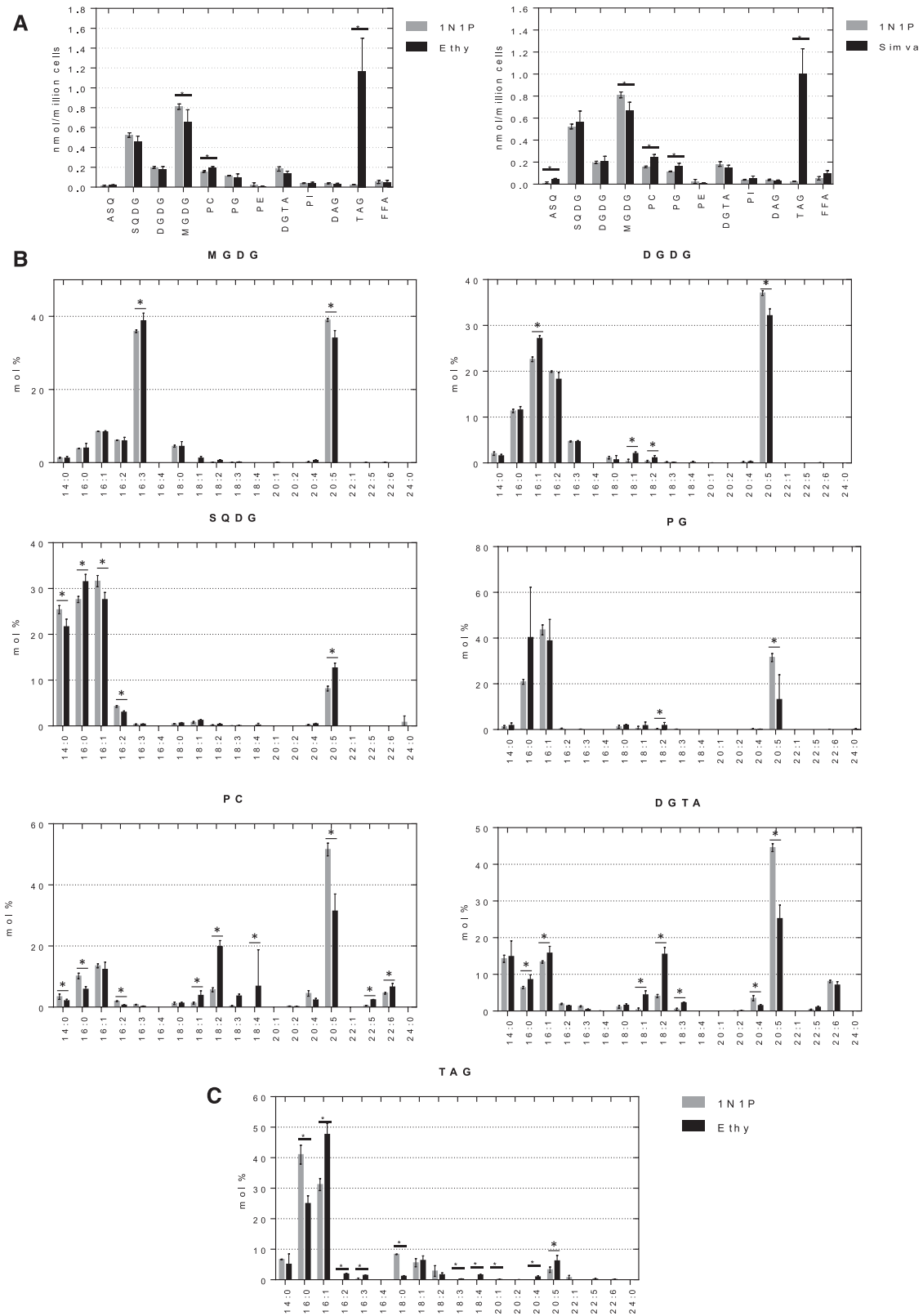


Figure 6. Glycerolipid profile following treatment with ethynylestradiol. *P. tricornutum* cells were cultivated in 1N1P medium until a cell density of 1×10^6 cells mL^{-1} was reached. Cells were then incubated for 48 h in the presence or absence of compounds, as indicated. Lipids were extracted, separated by thin-layer chromatography (TLC), and analyzed as described in “Materials and Methods.” A, Glycerolipid profiles following treatments with $30 \mu\text{M}$ ethynylestradiol and simvastatin.

2004; Dolch and Maréchal, 2015; Sayanova et al., 2017). The elongation occurs on FAs linked to CoA (as acyl-CoAs), whereas desaturations should occur on FAs linked to membrane lipids, possibly PC and/or DGTA, in *P. tricornutum* (Dolch and Maréchal, 2015; Sayanova et al., 2017). The process is so fast that the unsaturated FA precursors of 20:5 (i.e. 20:4, 20:3, 18:4, 18:3, 18:2, and 18:1) are barely detected in *P. tricornutum* and represent a low percentage. Following treatment with ethynylestradiol, the decrease in 20:5 coincides with a decrease of 20:4 and an increase of the proportion of their unsaturated FA precursors in both PC (18:4, 18:3, 18:2, and 18:1) and DGTA (18:4, 18:3, and 18:2). Therefore, ethynylestradiol appears to specifically disturb the channeled production of 20:5 via these two lipids, supporting the idea that both PC and DGTA can be platform lipids for the elaboration of EPA in *P. tricornutum*.

In parallel to this alteration of FA elongation and desaturation generating VLC-PUFAs, TAG content increased (Fig. 6A, left). The TAG profile was modified, with higher proportions in FAs derived from membrane lipids, such as 16:1 and 20:5, and including unsaturated FAs, which are uncommon in *P. tricornutum* TAG, such as 16:2, 16:3, and 18:4 (Fig. 6C). Altogether, these results indicate that ethynylestradiol impairs EPA elaboration via PC and DGTA, destabilizes the MGDG/PC balance, and triggers a turnover of FAs deriving from membrane lipids to TAG.

Transcriptomic Reprogramming Induced by Ethynylestradiol

The striking modification of the glycerolipid profile, showing an unsuspected disruption of EPA biosynthesis and a strong reallocation of carbon, suggested that *P. tricornutum* might operate an important transcriptomic reprogramming. *P. tricornutum* cells were treated for 4 d in independent biological triplicates with 0, 10, and 20 μM ethynylestradiol, conditions known to trigger TAG accumulation with moderate impact on growth (Supplemental Fig. S4). RNA sequencing analysis was performed with an Illumina HiSeq 4000 system, as described in "Materials and Methods."

We found 962 genes differentially expressed with a \log_2 fold change (Log_2FC) > 1 in at least one of the comparisons (i.e. comparing ethynylestradiol supplies at 0 versus 10 μM , 0 versus 20 μM , or 10 versus 20 μM) and with P values lower than 0.05 (Supplemental Table S1). A partition of differentially expressed genes was performed using the k-means method, with the number of partitions set to six (Liu et al., 2014; Dolch et al., 2017a). Each group or cluster consisted of genes with

similar expression profiles following treatments with ethynylestradiol (Fig. 7). Two clusters comprised genes down-regulated following treatments, group 1 (DR_1) containing genes with the strongest magnitude in expression decline (in the -2 to -4 Log_2FC range) and group 5 (DR_2) with moderate but significant expression decline ($\text{Log}_2\text{FC} \sim -1$ to -2). Four clusters comprised genes up-regulated following ethynylestradiol treatments, groups 2, 3, 4, and 6 (UR_1 , UR_2 , UR_3 , and UR_4 , respectively); UR_1 and UR_3 showed the most moderate change levels ($\text{Log}_2\text{FC} \sim 1$), and UR_2 and UR_4 showed the highest variation magnitude ($\text{Log}_2\text{FC} \sim 2-4$).

For each group, we next asked whether Gene Ontology (GO) terms were enriched, using the GOseq R package, with P values lower than 0.05 or 0.1 (Young et al., 2010; Supplemental Table S2). We then mined the results, focusing on carbon metabolism: the putative enrichment of GO terms corresponding to glycolysis, phosphoenolpyruvate production, pyruvate production, acetyl-CoA production, mevalonate pathway, and glycerolipid production (Supplemental Table S2).

UR_1 was characterized by a moderate enrichment in genes involved in lipid biosynthesis ($P < 0.1$). A GO enrichment in terms corresponding to the mevalonate pathway was clearly observed in the UR_2 cluster, both at the molecular function (diphosphomevalonate decarboxylase activity; $P < 0.05$) and biological process (isopentenyl diphosphate biosynthetic process, mevalonate pathway; $P < 0.05$) levels. The UR_2 cluster also was enriched in GO terms corresponding to glycolysis and pyruvate metabolism with $P < 0.1$. UR_3 was not enriched in GO terms corresponding to carbon metabolism. The UR_4 cluster also was enriched in GO terms corresponding to acetyl-CoA biosynthesis from pyruvate ($P < 0.05$). In down-regulated clusters, DR_1 did not show any clear enrichment in GO terms linked to carbon metabolism, whereas DR_2 showed an enrichment in terms corresponding to gluconeogenesis ($P < 0.05$).

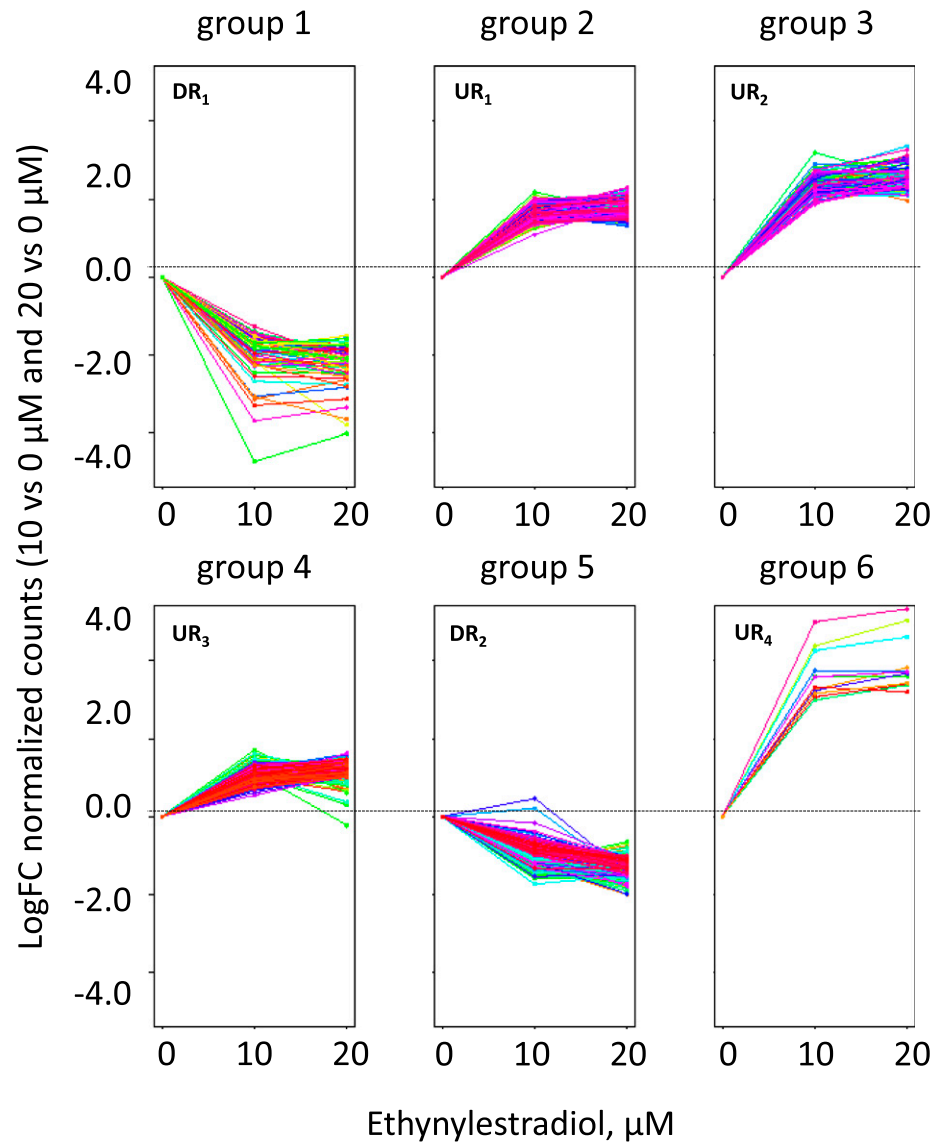
This analysis of the function of differentially expressed genes highlights that glycolysis was likely stimulated, whereas gluconeogenesis was arrested, and that the mevalonate pathway was up-regulated, consistent with a response to an agent that blocks sterol metabolism. Some genes involved in carbon metabolism also appear tuned toward the production of acetyl-CoA from pyruvate, which was then directed toward FAs and lipids. One has to keep in mind that GO term analyses depends on the extent of GO annotation in the *P. tricornutum* genome, which has not been completed.

We examined more carefully the corresponding metabolic pathways. It has been demonstrated that the isopentenyl-diphosphate precursor used for sterol biosynthesis derives from the cytosolic mevalonate

Figure 6. (Continued.)

Glycerolipids are expressed in nmol per million cells. B, Fatty acid profiles of membrane glycerolipids following treatment with 30 μM ethynylestradiol. C, Fatty acid profile of TAG following treatment with 30 μM ethynylestradiol. Data correspond to biological triplicates \pm SD. ASQ, Acylsulfoquinovosyldiacylglycerol; DAG, diacylglycerol; Ethy, ethynylestradiol; FFA, free fatty acid; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; Simva, simvastatin. *, $P < 0.05$ (Student's t test). Error bars indicate SD.

Figure 7. K-means clustering of *P. tricornutum* differentially expressed genes in response to increasing doses of ethynylestradiol. Only differentially expressed genes with a $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ in at least one of the contrasts (i.e. comparing ethynylestradiol supplies at 10 versus 0 μM , 20 versus 0 μM , or 20 versus 10 μM) and with $P < 0.05$ (Wald test) were considered for further analyses. A partition of differentially expressed genes was performed using the k-means method, with the number of partitions set to six and clustering based on a Euclidian distance (Liu et al., 2014). Two clusters comprise genes down-regulated following treatments: group 1 (DR_1), containing genes with the strongest magnitude in expression decline (in the -2 to -4 Log_2FC range); and group 5 (DR_2), with moderate but significant expression decline ($\text{Log}_2\text{FC} \sim -1$). Four clusters comprise genes up-regulated following ethynylestradiol treatments: groups 2, 3, 4, and 6 (UR_1 , UR_2 , UR_3 , and UR_4 , respectively).



pathway rather than the plastid-localized 1-desoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway (Cvejić and Rohmer, 2000). Supplemental Table S3 shows the dose-dependent response of genes involved in sterol biosynthesis, first via the mevalonate route: in the most upstream section of the pathway, the expression of the HMG-CoA synthase gene, *HMGs* (Phatr3_J16649), increased in a dose-dependent manner, whereas the expression of the mevalonate kinase gene, *MK* (Phatr3_J53929), was strongly attenuated. One gene coding for a putative geranyl-diphosphate synthase (Phatr3_J47271) was strongly down-regulated, whereas a geranyl-diphosphate/farnesyl-diphosphate synthase (Phatr3_J49325) was up-regulated, illustrating the fine-tuning of different redundant enzymes within the sterol pathway likely involved in specific physiological or developmental processes. In the most downstream part of the pathway, the genes coding for the putative 14- α -

demethylase, *CYP51* (Phatr3_J31339), 3- β -hydroxysteroid- Δ (8), Δ -7-isomerase (Phatr3_J36801), Δ -7-sterol Δ -5-dehydrogenase (Phatr3_J14208), Δ -7-sterol reductase (Phatr3_J30461), and sterol C-22 desaturase, *CYP710* (Phatr3_J51757), were strongly up-regulated in a dose-dependent manner by the treatment with ethynylestradiol. Interestingly, genes coding for cytochrome P450 enzymes, possibly targeted by ethynylestradiol (most importantly *CYP710*), were strongly activated. We wondered whether the expression of genes involved in the production of isopentenyl diphosphate via the 1-desoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway also could be altered by the treatment, but no specific change could be detected (Supplemental Table S3). Therefore, the reprogramming of sterol biosynthesis genes combines an activation of genes of the *CYP* family possibly compensating for the inhibition by ethynylestradiol, whereas others, most importantly

MK, act like general bottlenecks and possibly reduce the flux of carbon through this pathway.

In Supplemental Table S4, we analyzed genes involved in glycerolipid metabolism, keeping in mind that mechanisms other than the control of steady-state levels of mRNA might occur, including posttranslational modifications and regulation of the stability of proteins. Surprisingly, only a few genes involved in FA and TAG biosynthesis were up-regulated. Consistent with an increase in acetyl-CoA production for FA synthesis, we noticed, for instance, that genes coding for dihydrolipoamide acetyltransferase components of the pyruvate dehydrogenase complex (Phatr3_J23850, Phatr3_EG02309, and Phatr3_J30113) and for the biotin carboxylase subunit of heteromeric acetyl-CoA carboxylase (Phatr3_J49339) were up-regulated. At the level of TAG biosynthesis, only one of the diacylglycerol acyltransferase (DGAT2C) genes was up-regulated (Phatr3_J31662). This, combined with possible variations of other DGAT protein levels and enzymatic activities, could support an activated synthesis of TAG. By contrast, at the level of TAG degradation, the expression of lipases was strikingly down-regulated: MAGL1 (Phatr3_J43352), SDP1-Like (Phatr3_J45518), TAGL-Like-A (Phatr3_J1971), PLA-A (Phatr3_J44005), PLA-B (Phatr3_J44066), and Patatin-Like-A (Phatr3_J43678). Likewise, genes involved in FA β -oxidation in both the peroxisome (Phatr3_J19979, Phatr3_J41969, Phatr3_J45947, Phatr3_J11319, Phatr3_J37372, and Phatr3_J31367) and the mitochondrion (Phatr3_J20310, Phatr3_J35240, Phatr3_J40988, Phatr3_J11811, Phatr3_J54494, and Phatr3_J18064) were down-regulated. Altogether, the transcriptomic reprogramming in response to ethynylestradiol highlights a down-regulation of genes involved in TAG catabolism rather than a strongly enhanced TAG biosynthesis, suggesting that TAG turnover could be slowed down in response to the chemical treatment.

Focusing on VLC-PUFAs, most genes involved in the biosynthesis of EPA (Δ 0-ELO-A, Phatr3_J49867; Δ 0-ELO-B, Phatr3_J16376; Δ 5-ELO-B, Phatr3_J34485; Δ 5-ELO-A, Phatr3_J9255; Δ 6-ELO-B2, Phatr3_J20508; HACD, Phatr3_J44831; ER- Δ 5-FAD-A, Phatr3_J46830; ER- Δ 5-FAD-B, Phatr3_J22459; and ER- Δ 6-FAD, Phatr3_J29488) were up-regulated. Only one of the genes was down-regulated, coding for Δ 6-ELO-B1 (Phatr3_J22274; Supplemental Table S4). This disruption of VLC-PUFA coincides with the up-regulation of the betaine lipid synthase, BTA-Like (Phatr3_J42872), involved in the biosynthesis of DGTA (Supplemental Table S4).

Taken together, and considering that posttranslational modifications and the control of protein levels also might occur, the transcriptomic response is consistent with the observed phenotype and highlights possible genes whose coordinated regulation could lead to a strong modification of the FA profiles in important membrane lipids (PC and DGTA), a modulation of the MGDG/PC ratio, and a carbon reallocation toward TAG by preventing TAG catabolism. This

scheme is very different from the transcriptomic reprogramming and lipid remodeling following nitrogen or phosphorus starvation, considered as a reference for industrial developments, in which TAG accumulates mainly following an orchestrated induction of FA synthesis genes and of multiple enzymes involved in TAG biosynthesis (Abida et al., 2015; Alipanah et al., 2015; Levitan et al., 2015).

DISCUSSION

Consistency of the Screen and Identification of Candidate Biological Processes Influencing TAG Levels in *P. tricornutum*

The use of an annotated library of compounds (i.e. containing small molecules characterized previously on known targets) allows an analysis of screening outputs and a more rapid deduction of target candidates compared with screenings of large-scale libraries containing tens of thousands of unannotated molecules. Here, we screened 1,200 compounds of the Prestwick Chemical Library using a multiparameter assay allowing the evaluation of cell abundance, TAG level, and chlorophyll fluorescence (Fig. 1) with appropriate statistical robustness based on Z' values. Possible biases or conditions leading to false positive or negative results have to be considered. An important bias lies in the choice of the library of compounds, which could be enriched in drugs developed to act on specific human pathogens, such as molecules binding to neurotransmitter receptors, being effective on metabolic disorders, on cancer, or on specific infectious diseases. This bias is a limitation on the number of target classes we can explore, but it also can be considered an advantage to identify molecules hitting a pathway at the level of multiple target enzymes. The miniaturized assay developed to measure whole-cell responses, allowing a selection of compounds that are active on the phenotype, also can produce false positive or negative results. The parameter used to estimate cell abundance was based on the fluorescence of Histone H4 fused to YFP, correlating linearly with cell counts from 0.1 to 0.55 mM NaNO₃ (Fig. 1; Supplemental Fig. S1). Therefore, cell abundance could be underestimated in conditions limiting protein biosynthesis. We confirmed variations of cell abundance following treatments with selected molecules using a Malassez counting chamber (Supplemental Fig. S3). Another important source of erroneous results lies in the use of Nile Red to stain TAG droplets. Nile Red staining allows relative comparisons within a batch of experiments and can react with other nonpolar lipids. Therefore, we confirmed the observed increase of Nile Red staining obtained following selected chemical treatments by direct analysis of glycerolipids.

Our primary screen of 1,200 compounds was performed by incubating *P. tricornutum* in the presence of molecules supplied at 10 μ M for 48 h (Fig. 2). We selected 160 compounds leading to an increase in Nile

Red staining above 120% of the average per plate, while maintaining a cell abundance above 50% of that of the control (Fig. 3), and we repeated the screen to discard false positives. A list of 40 molecules was then selected and tested in independent triplicates, and we selected the most active molecules in at least two of the three independent assays. This secondary screen allowed the final selection of 34 hit molecules (Table I). The success of a screen can be evaluated if some of the selected molecules have close chemical structures (showing consistency in the detection of an active chemical scaffold) or if distinct molecules hitting the same biological pathway are selected. Here, the screen pointed to a limited number of biological processes or pathways (i.e. nucleic acid biosynthesis and cell division, membrane receptors and transporters, cyclic nucleotide or oxylipin signaling, and sterol metabolism; Table I). The consistency of the screen was further illustrated by the presence of similar chemical structures: simvastatin and mevastatin share a common statin scaffold, estrone and ethynylestradiol are both estrogens, serotonin is the ligand of serotonin receptors, and alverin and piperperone are both antagonists of the same receptor. The results of this screen pointed toward sterol metabolism.

Five molecules were selected based on the detection of their bioactivity in all of the tests, likely interference with mitochondria and/or the chloroplast electron transport chain (antimycin A), microtubule dynamics (nocodazole), sterol metabolism (ethynylestradiol and mevastatin), and purine catabolism (allopurinol). We confirmed that the increase in Nile Red staining was dose dependent (Fig. 4), with an arrest of growth induced at concentrations higher than 10 to 50 μM , depending on the molecules. This indicates that the molecules might hit vital targets and/or that high doses increase unspecific toxicity. The advantage of using chemicals over conventional genetics is well known when addressing the question of essential proteins: one can study a phenotypic response at sublethal concentrations, decrease the activity of the target of interest with different magnitudes, and trigger the phenotypic response at any developmental stage by simply adding the compound and eventually combining with other molecules or genetic backgrounds (Soleilhac et al., 2010). In addition, the chemical structures of selected molecules might be close enough to those of natural molecules to suggest a mimicry of a natural signaling process.

The output of the screen also was consistent with some previous studies, showing an increase of TAG (1) after the impairment of microtubule dynamics (using taxol) and cell division in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) cells (Meř et al., 2017), (2) after the chemical inhibition or genetic knockdown of sterol metabolism enzymes in *P. tricornutum* (Fabris et al., 2014), or (3) after incubation with nitric oxide (Dolch et al., 2017a), a known activator of nucleotide cyclases, opposing cyclic nucleotide phosphodiesterases (Francis et al., 2010). Focusing on compounds acting on sterol metabolism, we expanded our tests to additional molecules that

were not screened initially but are known to act at the levels of other enzymes of the pathway (Fig. 5) and confirmed that carbon partitioning was balanced between this pathway and TAG net production. The consistency of the screen suggests that all of the biological processes we highlighted are promising for more in-depth investigations.

Focused Analysis of the *P. tricornutum* Response to Ethynylestradiol

Ethynylestradiol is a synthetic derivative of the natural hormones estrone and estradiol (Inhoffen and Hohlweg, 1938). The presence of the ethynyl group makes this estrogenic steroid more resistant to oxidation and stable in the environment, with a half-life higher than 100 d in water under aerobic conditions (Adeel et al., 2017). The water solubility of ethynylestradiol is 16 mM at 20°C, and the logarithm of its *n*-octanol/water partition coefficient (or $\log P$) is 3.63 (Adeel et al., 2017), indicating a strong efficiency in crossing cell barriers (Lipinski et al., 2001). Used in birth control pills (Jensen and DeSombre, 1973), ethynylestradiol's binding affinity to the estrogen receptor is 2 times higher in humans and up to 5 times higher in some fish species compared with natural hormones (Aris et al., 2014). Both natural and synthetic estrogens are endocrine disruptors and pose ecological hazards following their discharge in the environment by anthropogenic practices (Aris et al., 2014; Adeel et al., 2017). High ethynylestradiol concentrations have an impact on sex determination in some fish species (Bhandari et al., 2015; Siegenthaler et al., 2017). Our knowledge of the effects of estrogen on phytoplankton is very scarce, with only two reports regarding a negative impact on growth in the green alga *C. reinhardtii* (Pocock and Falk, 2014) and in the pennate diatom *Navicula incerta* (Liu et al., 2010). Interestingly, treatment with 10 μM ethynylestradiol triggered an increase in total acyl lipids in *N. incerta* (Liu et al., 2010), possibly due to the increase in TAG observed here in *P. tricornutum*. In addition, a bioaccumulation of ethynylestradiol was observed in *N. incerta* (Liu et al., 2010, 2012), supporting that diatoms could concentrate this molecule over time. The study of the effect of high concentrations of molecules (i.e. an acute exposure) could mimic the physiological situation after a long-term exposure to low doses.

The mode of action of ethynylestradiol in *P. tricornutum* is unknown; however, past reports of the inhibition of cytochrome P450 enzymes involved in sterol metabolism (Table I; Fig. 5) and the up-regulation of CYP genes (Supplemental Table S3) suggest that one or more CYP proteins might be targeted. The biodegradation of ethynylestradiol by *N. incerta* (Liu et al., 2010) also suggests that some CYP enzyme(s) might eventually use this estrogen as a substrate, leading to its bioconversion into a nonactive compound. Thus, diatoms might contribute to reducing the environmental

concentration of this endocrine disruptor and decrease the detrimental impact on other aquatic species feeding on diatoms (Liu et al., 2012).

The phenotypic response to ethynylestradiol is marked by a strong accumulation of TAG, which does not seem to balance a dramatic decline of polar lipid quantities, besides a moderate decrease in MGDG (Fig. 6). This response suggests that TAG might simply accumulate following the disturbance of sterol biosynthesis, leading to an accumulation of acetyl-CoA diverted toward FA and TAG biosynthesis. This quantitative reallocation of carbon from one sink (sterols) to another (TAG) is supported by the up-regulation of genes involved in acetyl-CoA biosynthesis and the down-regulation of genes involved in TAG degradation (Supplemental Table S4). In addition, gene expression profiles support a modification of fluxes within the central carbon metabolism, as reported previously after chemical treatment performed on *C. reinhardtii* (Wase et al., 2017). In the current status of *P. tricornutum* genome annotation, and without precise subcellular compartmentalization of central carbon metabolism genes, the fluxes are difficult to finely assess. Nevertheless, ethynylestradiol treatment seems to induce an arrest of gluconeogenesis, also observed when *P. tricornutum* is subjected to nitrogen starvation (Alipanah et al., 2015), and an increased expression of genes involved in glycolysis and acetyl-CoA production. Chrysolaminarin is a polysaccharide that can be an alternative form of carbon storage competing with TAG. Whereas two independent studies have shown that the knockout of the UDP-Glc-pyrophosphorylase/phosphoglucomutase gene (Phatr3_EG02613) led to an increase in TAG (Daboussi et al., 2014; Zhu et al., 2016), this gene was up-regulated following treatment with ethynylestradiol (Supplemental Table S1), suggesting that the interruption in the flux of carbon toward sterols might be diverted toward the two forms of carbon storage, chrysolaminarin and TAG. We did not analyze the metabolomic status of carbohydrates. This should be investigated in the future.

Following treatment with ethynylestradiol, the analysis of FAs within each class of glycerolipids showed striking differences, including in membrane glycerolipids, in particular a decrease in the proportion of 20:5 FAs in all major lipid classes (i.e. MGDG, DGDG, PG, PC, and DGTA; Fig. 6B). The synthesis of 20:5 FAs starts in the endoplasmic reticulum from short-chain acyl-CoAs, including saturated molecular species such as 16:0 (Dolch et al., 2017b). It proceeds by a series of elongations of acyl-CoAs and of desaturation on FAs linked to membrane lipids, possibly PC and/or DGTA (Sayanova and Napier, 2004; Dolch and Maréchal, 2015; Sayanova et al., 2017). Elongation includes $\Delta 0$ -ELOs (16:0→18:0) and $\Delta 6$ -ELOs (18:3→20:3; Dolch et al., 2017b). Ethynylestradiol treatment induced an increase of the proportion of FA precursors for VLC-PUFAs, in both PC (18:4, 18:3, 18:2, and 18:1) and DGTA (18:4, 18:3, and 18:2), before elongation by a $\Delta 6$ -ELO. Consistently, although most genes involved in 20:5 FA

biosynthesis were up-regulated, including the gene coding for the betaine lipid platform on which desaturation occurs, $\Delta 6$ -ELO-*B1* (Phatr3_J22274) was strikingly down-regulated (Supplemental Table S4). This result suggests that transcriptomic control of a $\Delta 6$ -ELO might occur when increasing doses of ethynylestradiol are provided. Based on these experiments, it is impossible to assess whether this down-regulation is due to an indirect or direct effect of ethynylestradiol. Although posttranslational regulation might occur in combination with the transcriptomic changes observed here, an interruption of 20:5 FA biosynthesis at the level of a $\Delta 6$ -ELO is expected based on lipid profiles, and this impairment coincides with a decrease of $\Delta 6$ -ELO-*B1* expression. This might be an additional mechanism altering glycerolipids following treatments with estrogens.

CONCLUSION

This study identified molecules that could be of interest for direct implementation in an industrial process aiming at triggering the accumulation of TAG in diatoms, which would be distinct from established methods such as nutrient starvation (Abida et al., 2015). One advantage of this approach is that it allowed us to determine cultivation conditions permitting the accumulation of TAG with lower impact on growth. The use of an annotated library of compounds allowed for the identification of some metabolic pathways that might be scrutinized in more detail for genetic engineering strategies in the future. Some of the identified pathways confirm past studies, such as nucleotide syntheses and cell division processes (Kim et al., 2017; Mei et al., 2017; Prioretti et al., 2017), sterol metabolism (Fabris et al., 2014; Gallo et al., 2017), or, indirectly, nitric oxide signaling (Dolch et al., 2017a). Other remarkable biological processes highlighted here, involving membrane receptors and transporters or oxylipin signaling, need to be investigated. The identification of compounds interfering with catecholamine metabolism, known to interfere with lipolysis in humans (Camell et al., 2017), raises the question of an analogous system in diatoms.

The discovery of two endocrine disruptors (ethynylestradiol and estrone) among the five more active molecules is one of the major results of this study. Ethynylestradiol has been reported to be used in aquaculture to develop single-sex populations of fish (Aris et al., 2014). Our study shows that these compounds potentially have a strong impact on phytoplankton, which needs to be addressed in environmental contexts. On the one hand, the mode of action likely implies interference with the metabolism in *P. tricornutum*, possibly via the inhibition of one or more CYP enzyme(s) and the reallocation of carbon from one sink (sterols) to TAG. This putative mechanism should be investigated in the future. On the other hand, VLC-PUFA biosynthesis is strikingly impaired, with an accumulation of intermediates upstream of 18- to

20-carbon acyl elongation, and coincides with the down-regulation of a gene involved in this specific elongation. This latter effect indicates that a specific transcriptomic control of VLC-PUFA biosynthesis might be activated directly or indirectly by estrogens. Treatment with ethynylestradiol might interfere with a process occurring in response to a natural sterol, either in an intracellular or a cell-to-cell signaling process. Although natural doses of ethynylestradiol have not been measured systematically in the past, with some reports indicating ~ 15 pM in seawater (Adeel et al., 2017), the capacity of pennate diatoms to accumulate estrogens (Liu et al., 2010, 2012) shows the relevance of studying these organisms following acute exposures. Future work is needed to address the question of the physiological processes chemically impaired by synthetic estrogens and to address the environmental consequences of the response of diatoms detailed here. Possible effects of the active compounds described here on other phytoplanktonic species also should be investigated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and the Library of Small Molecules

Chemicals used in the composition of growth media and solvents were obtained from Sigma-Aldrich. The Prestwick Chemical Library of 1,200 compounds was obtained from Prestwick Chemical and consists exclusively of U.S. Food and Drug Administration-approved compounds. The chemical library was stored at -20°C at a 10 mM concentration in 100% DMSO, and 50- μL working solutions were prepared in 48-well plates before screening.

Cultivation of *Phaeodactylum tricornutum*

Experiments were performed with the *P. tricornutum* Bohlin Strain 8.6 CCMP2561 (Culture Collection of Marine Phytoplankton, now known as NCMA: National Center for Marine Algae and Microbiota) and with PtYFP, a strain expressing a Histone H4 fused to YFP at the N terminus, kindly provided by Angela Falciatore (Université Pierre et Marie Curie; Saut et al., 2007). *P. tricornutum* cells were maintained and grown in 50-mL cultures at 20°C in 250-mL flasks in a modified ESAW medium [NaCl 362.7 mM, Na_2SO_4 25 mM, KCl 8.03 mM, NaHCO_3 2.067 mM, KBr 0.725 mM, H_3BO_3 0.372 mM, NaF 0.0657 mM, MgCl_2 47.18 mM, CaCl_2 9.134 mM, SrCl_2 0.082 mM, Na_2 -glycerophosphate 21.8 μM , Na_2SiO_3 105.6 μM , Na_2EDTA 14.86 μM , $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 5.97 μM , FeCl_3 0.592 μM , MnSO_4 2.42 μM , ZnSO_4 0.254 μM , CoSO_4 0.0569 μM , Na_2MoO_4 0.52 μM , H_3BO_3 61.46 μM , Na_2SeO_3 10 nM, biotin (vitamin H) 8.18 nM, cobalamin (vitamin B12) 2.94 nM, and thiamine (vitamin B1) 0.594 μM ; Falciatore et al., 2000], using either 0.55 mM NaNO_3 and 2.2×10^{-2} mM NaH_2PO_4 or 10 times enriched nitrogen and phosphate sources (ESAW 10N10P, containing 5.5 mM NaNO_3 and 0.22 mM NaH_2PO_4 ; Abida et al., 2015). Cells were grown on a 12-h/12-h light ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/dark cycle. Cells were subcultured twice per week by inoculating 10^6 cells mL^{-1} with fresh medium. Growth was evaluated using a Malassez cell counting chamber or by the A_{730} using a TECAN plate reader.

Automated High-Throughput Screening

The screening of small molecules was performed using the automated multimodule platform from the Centre de Criblage pour des Molecules Bioactives. An 800-mL culture of PtYFP was grown in ESAW 1N1P medium until the cell concentration reached 2.5×10^6 cells mL^{-1} . Cells were centrifuged at 3,500 rpm for 5 min, and the supernatant was gently discarded. Cells were then resuspended in fresh ESAW 0N1P (without nitrogen and containing 2.2×10^{-2} mM NaH_2PO_4) and adjusted to a final concentration of 10^6 cells mL^{-1} . Clear 48-well plates (NUNC; 055431) were prepared by adding a 4-mm glass bead (Roth; HH55.1)

in each well. First, 450- μL aliquots of PtYFP cells were dispensed into the wells corresponding to high-TAG controls, completed with 50 μL of 0N1P medium (cells incubated in 500 μL of low-nitrogen medium). NaNO_3 was then added to the remaining PtYFP cell suspension (1×10^6 cells mL^{-1}) and mixed gently to obtain a nitrogen-rich medium (ESAW 1N1P containing 0.55 mM NaNO_3 and 2.2×10^{-2} mM NaH_2PO_4). Compounds from the Prestwick Chemical Library were then added in each well to reach final incubation conditions of 10 μM of compounds, 0.5% (v/v) DMSO, and 1×10^6 cells mL^{-1} . Glass beads aided culture growth in the 48-well plates. The cultures were incubated for 48 h at 100 rpm under a 12-h/12-h light ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/dark cycle at 20°C in an artificial climate incubator (HT multitrax; Infors). Control conditions included cells in ESAW 1N1P (low-TAG controls) and 0N1P (high-TAG controls) grown without any added drug. After 48 h, 150 μL was transferred from the 48-well plate to a black 96-well plate (Greiner; 655086), and YFP and chlorophyll fluorescence levels were measured at excitation/emission wavelengths of 515/530 nm and 440/680 nm, respectively, using the TECAN Infinite M1000 plate reader. To assess the accumulation of neutral lipids, 40 μL of Nile Red ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 9-diethylamino-5-benzo[*a*]-phenoxazinone in DMSO) was added per well and incubated for 20 min at room temperature. The concentration of Nile Red was defined based on optimal staining of lipid droplets with lower background detection. Although a smaller volume of Nile Red could be used (Wase et al., 2015), a 40- μL volume was defined to prevent automated pipetting variations. Nile Red fluorescence was measured at excitation/emission wavelengths of 530/580 nm. Compounds triggering an increase in Nile Red fluorescence levels were selected for a secondary screen, with priority given to hit molecules triggering both high Nile Red and high YFP fluorescence. A total of 160 hit molecules were reevaluated at 10 μM and, based on the obtained results, 40 compounds were selected for a tertiary screen.

Dose-Response Assays

A double-strength concentration range of selected compounds was obtained by dilution in ESAW 1N1P medium with 1% (v/v) DMSO, and 250 μL was dispensed in triplicate in 48-well plates (NUNC; 055431). The same volume (250 μL) of a *P. tricornutum* culture at a cell concentration of 2×10^6 cells mL^{-1} was added in each well to reach a final condition of 1×10^6 cells mL^{-1} and 0.5% (v/v) DMSO in ESAW medium. A 4-mm glass bead (Roth; HH55.1) was added in each well to aid culture growth in the 48-well plates. Plates were then incubated for 48 h at 100 rpm under a 12-h/12-h light ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/dark cycle at 20°C in an artificial climate incubator (HT multitrax; Infors). Control conditions included untreated cells with 0.5% (v/v) DMSO and cells in ESAW medium without NaNO_3 . After 48 h, 300 μL was transferred from the 48-well plate to a clear 96-well plate (NUNC; 55260). The A_{730} was measured using the TECAN Infinite M1000 plate reader. The concentration of each culture was calculated using the linear relationship between cells mL^{-1} counting assessed with a Malassez chamber and A_{730} . A 160- μL aliquot was transferred to a black 96-well plate (Greiner; 655086), and chlorophyll fluorescence was measured at excitation and emission wavelengths of 440 and 680 nm, respectively. Then, 40 μL of Nile Red ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in DMSO) was added in each well, and cells were incubated for 20 min at room temperature. Nile Red fluorescence was measured at excitation and emission wavelengths of 530 and 580 nm, respectively. The relative fluorescence values of Nile Red and chlorophyll were normalized per million cells and compared as a percentage of the untreated control. The volume of culture remaining in the NUNC clear 96-well plates (140 μL) was used to measure PSII efficiency, represented by the F_v/F_m value.

Photosynthetic Parameters

To determine photosynthesis parameters in cell cultures, room temperature fast chlorophyll fluorescence kinetics were measured using a Speedzen MX fluorescence imaging system (JBeamBio) with settings described previously (Johnson et al., 2009; Allore et al., 2013). A 140- μL volume of *P. tricornutum* culture was transferred to a transparent 96-well plate and dark incubated for 15 to 30 min before measurements. Excitation was performed in the blue range ($\lambda = 450$ nm; F_0). F_0 is the steady-state fluorescence in dark-adapted cultures, F_m is the maximal fluorescence after a saturating light pulse with green light (520 nm) of dark-adapted cultures, F_m' is the maximal fluorescence after a saturating light pulse with green light (520 nm) of light-adapted cultures, and F_v is the difference between F_m and F_0 . With these parameters, the maximum efficiency of energy conversion of PSII can be calculated as F_v/F_m (Butler and Kitajima, 1975; Misra et al., 2012).

Glycerolipid Analyses

For lipid analysis, *P. tricornutum* CCMP632/CCAP 1055/1 cultures were initiated at a 1×10^6 cells mL⁻¹ concentration and incubated at 20°C with 100 rpm under a 12-h/12-h light (50 μmol photons m⁻² s⁻¹)/dark cycle. Depending on the treatment, cells were collected at day 2, 4, or 7 in 50-mL Falcon tubes via centrifugation at 3,500 rpm for 10 min. Pellets were immediately snap frozen by transfer in liquid nitrogen and stored at -80°C until lipid extraction. After freeze drying, pellets were suspended in 4 mL of boiling ethanol for 5 min to prevent lipid degradation, and lipids were extracted as described earlier (Abida et al., 2015) by the addition of 2 mL of methanol and 8 mL of chloroform at room temperature. The mixture was then saturated with argon and stirred for 1 h at room temperature. After filtration through glass wool, cell remains were rinsed with 3 mL of chloroform:methanol (2:1, v/v), and 5 mL of 1% (w/v) NaCl was then added to the filtrate to initiate biphasic formation. The chloroform phase was dried under argon before solubilizing the lipid extract in pure chloroform. Total glycerolipids were quantified from their FAs: in an aliquot fraction, a known quantity of the 15:0 FA standard was added, and the FAs present were transformed as methyl esters (FAME) by a 1-h incubation in 3 mL of 2.5% (v/v) H₂SO₄ in pure methanol at 100°C. The reaction was stopped by the addition of 3 mL of water and 3 mL of hexane. The hexane phase was analyzed by gas chromatography-flame ionization detection (Perkin Elmer) on a BPX70 (SGE) column. FAMES were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma-Aldrich) and quantified by the surface peak method using the 15:0 standard for calibration. To quantify the various classes of neutral and polar glycerolipids, lipids were separated by TLC onto glass-backed silica gel plates (Merck) using two distinct resolving systems. To isolate neutral lipids including TAG and free FAs, lipids were resolved by TLC run in one dimension with hexane:diethylether:acetic acid (70:30:1, v/v). To isolate membrane glycerolipids, lipids were resolved by two-dimensional TLC. The first solvent was chloroform:methanol:water (65:25:4, v/v) and the second was chloroform:acetone:methanol:acetic acid:water (50:20:10:10:5, v/v). Lipids were then visualized under UV light, after spraying with 2% (w/v) 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid in methanol, and scraped off the plate. FAMES were then prepared by methanolysis directly from the silica and quantified by gas chromatography-flame ionization detection as described above.

Screening Statistics

The quality of the screening assay was assessed based on the calculation of the Z' factor (Zhang et al., 1999) with the following equation:

$$Z' = 1 - (3\sigma_{c+} + \sigma_{c-}) / |\mu_{c+} - \mu_{c-}|$$

where σ_{c+} and σ_{c-} are the SD of readout values obtained with positive and negative controls and μ_{c+} and μ_{c-} are the means of readout values obtained with positive and negative controls (i.e. high-TAG and low-TAG controls, respectively).

Transcriptomic Analyses

P. tricornutum cells were grown in 50 mL of ESAW medium in 100-mL flasks until they reached a minimum concentration of 6×10^6 cells mL⁻¹. Cells were then incubated 4 d with increasing concentrations of 17 α -ethynylestradiol [19-nor-17 α -pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol] provided at 0, 10, and 20 μM, with a final concentration of 0.5% (v/v) DMSO. Following treatment, frozen cells (2×10^8 cells) were sent to BGI for RNA extraction using the TRIzol reagent (Chomczynski and Sacchi, 1987), allowing the collection of 10 to 20 μg of RNA per sample. Quality was assessed based on the 28S/18S ratio and RNA integrity number tests using an Agilent 2100 Bioanalyzer. Libraries were prepared for stranded 100-bp paired-end sequencing according to BGI procedures. In brief, double-stranded and single-stranded DNA were degraded using DNase I; poly(A)-containing mRNA molecules were purified from total RNA using poly(T) oligo-attached magnetic beads; and mRNAs were fragmented into small pieces using a Covaris M220 focused ultrasonicator. First-strand cDNA was then generated using random hexamer-primed reverse transcription. This was followed by a second-strand cDNA synthesis, and cDNAs were purified. The synthesized cDNAs were subjected to end repair and then were 3' adenylated. BGI-designed adaptors were ligated to the ends of these 3' adenylated cDNA fragments. The products of the ligation reaction were purified on Tris-acetate EDTA agarose gels and amplified by PCR. Obtained libraries were

validated using the Agilent 2100 Bio-analyzer and ABI StepOnePlus Real-Time PCR analysis. Samples were analyzed independently using the Illumina HiSeq 4000 system (20 M reads), generating on average 22,555,637 raw sequencing reads and then 22,368,247 clean reads after the removal of adaptor sequences, high content of unknown bases, and low-quality reads (BGI proprietary pipeline). After filtering, clean reads were first mapped on the most recent genome version of *P. tricornutum* (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum/Info/Index) using the HISAT (Kim et al., 2015)/Bowtie2 (Langmead et al., 2009) tool for a primary read counting. The average mapping ratio with reference genes was 77.54%. The gene expression level was quantified using RSEM (Li and Dewey, 2011). For each sample, the number of identified expressed genes was counted, and the proportion to total gene number in the database was calculated (Supplemental Table S5). For gene expression comparisons, data were filtered based on the detection of one read in at least one sample per treatment or genomic mutation and then normalized using the DESeq2 method (Varet et al., 2016). Clustering was achieved based on expression profiles as described previously (Dolch et al., 2017a).

Accession Numbers

Sequences from the *P. tricornutum* genome analyzed more carefully in this study can be found via Ensembl! under the following accession numbers: Phatr3_EG01524, Phatr3_EG01947, Phatr3_EG01955, Phatr3_EG02208, Phatr3_EG02286, Phatr3_EG02309, Phatr3_EG02454, Phatr3_EG02496, Phatr3_EG02521, Phatr3_EG02619, Phatr3_J10068, Phatr3_J10497, Phatr3_J11319, Phatr3_J11390, Phatr3_J11811, Phatr3_J11916, Phatr3_J12420, Phatr3_J12420, Phatr3_J12431, Phatr3_J12642, Phatr3_J12740, Phatr3_J12884, Phatr3_J12902, Phatr3_J13073, Phatr3_J13076, Phatr3_J14202, Phatr3_J15031, Phatr3_J15211, Phatr3_J15730, Phatr3_J16364, Phatr3_J16376, Phatr3_J17086, Phatr3_J17720, Phatr3_J17720, Phatr3_J18029, Phatr3_J18064, Phatr3_J18940, Phatr3_J18940, Phatr3_J1971, Phatr3_J19979, Phatr3_J20143, Phatr3_J20143, Phatr3_J20310, Phatr3_J20342, Phatr3_J20460, Phatr3_J20460, Phatr3_J20508, Phatr3_J21116, Phatr3_J21201, Phatr3_J21988, Phatr3_J22122, Phatr3_J2215, Phatr3_J22274, Phatr3_J22357, Phatr3_J22404, Phatr3_J22459, Phatr3_J22510, Phatr3_J22554, Phatr3_J22677, Phatr3_J22803, Phatr3_J23639, Phatr3_J23850, Phatr3_J23913, Phatr3_J24195, Phatr3_J24610, Phatr3_J24739, Phatr3_J25769, Phatr3_J25932, Phatr3_J26029, Phatr3_J26714, Phatr3_J28009, Phatr3_J28068, Phatr3_J28652, Phatr3_J28797, Phatr3_J29157, Phatr3_J29488, Phatr3_J29702, Phatr3_J30113, Phatr3_J30145, Phatr3_J30282, Phatr3_J30514, Phatr3_J31367, Phatr3_J31440, Phatr3_J31492, Phatr3_J31662, Phatr3_J31994, Phatr3_J31994, Phatr3_J32083, Phatr3_J3262, Phatr3_J32902, Phatr3_J33198, Phatr3_J33435, Phatr3_J33720, Phatr3_J33864, Phatr3_J33864, Phatr3_J34485, Phatr3_J34526, Phatr3_J35240, Phatr3_J36821, Phatr3_J37086, Phatr3_J37086, Phatr3_J37367, Phatr3_J37372, Phatr3_J37652, Phatr3_J38509, Phatr3_J39710, Phatr3_J39949, Phatr3_J40163, Phatr3_J40200, Phatr3_J40261, Phatr3_J40880, Phatr3_J40988, Phatr3_J41423, Phatr3_J41423, Phatr3_J41515, Phatr3_J41570, Phatr3_J41886, Phatr3_J41969, Phatr3_J42398, Phatr3_J42683, Phatr3_J42872, Phatr3_J43010, Phatr3_J43099, Phatr3_J43116, Phatr3_J43320, Phatr3_J43352, Phatr3_J43463, Phatr3_J43469, Phatr3_J43678, Phatr3_J43773, Phatr3_J43773, Phatr3_J43773, Phatr3_J44005, Phatr3_J44028, Phatr3_J44066, Phatr3_J44231, Phatr3_J44401, Phatr3_J44584, Phatr3_J44645, Phatr3_J44806, Phatr3_J44831, Phatr3_J45223, Phatr3_J45510, Phatr3_J45510, Phatr3_J45518, Phatr3_J45518, Phatr3_J45758, Phatr3_J45947, Phatr3_J46175, Phatr3_J46453, Phatr3_J46570, Phatr3_J46595, Phatr3_J46830, Phatr3_J47389, Phatr3_J48423, Phatr3_J48664, Phatr3_J48778, Phatr3_J48778, Phatr3_J48799, Phatr3_J48859, Phatr3_J48977, Phatr3_J49163, Phatr3_J4918, Phatr3_J49339, Phatr3_J49462, Phatr3_J49524, Phatr3_J49544, Phatr3_J49771, Phatr3_J49867, Phatr3_J50356, Phatr3_J50742, Phatr3_J50770, Phatr3_J51214, Phatr3_J51454, Phatr3_J51519, Phatr3_J52268, Phatr3_J52368, Phatr3_J52648, Phatr3_J5271, Phatr3_J54017, Phatr3_J54068, Phatr3_J54151, Phatr3_J54168, Phatr3_J54222, Phatr3_J54494, Phatr3_J54528, Phatr3_J54709, Phatr3_J54709, Phatr3_J54974, Phatr3_J54983, Phatr3_J55069, Phatr3_J55111, Phatr3_J55153, Phatr3_J55157, Phatr3_J55192, Phatr3_J55209, Phatr3_J5527, Phatr3_J7164, Phatr3_J7678, Phatr3_J8663, Phatr3_J8860, Phatr3_J8975, Phatr3_J9255, Phatr3_J9316, Phatr3_J9538, Phatr3_J9619, Phatr3_J9709, Phatr3_J9794, Phatr3_J9845, Phatr3_J9859, Phatr3_J23913, Phatr3_J1664, Phatr3_J16870, Phatr3_J53929, Phatr3_EG02641, Phatr3_EG02359, Phatr3_EG00741, Phatr3_J12533, Phatr3_EG02290, Phatr3_J47271, Phatr3_J49325, Phatr3_EG02293, Phatr3_J10824, Phatr3_J49447, Phatr3_J31339, Phatr3_J10852, Phatr3_J48864, Phatr3_J36801, Phatr3_J14208, Phatr3_J30461, Phatr3_J51757, Phatr3_J1689, Phatr3_J9258, Phatr3_J12330, Phatr3_EG02383, Phatr3_J12330, Phatr3_J44955, and Phatr3_J41845.

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Measurement of *P. tricornutum* cell abundance.

Supplemental Figure S2. Evaluation of miniature assay robustness.

Supplemental Figure S3. Response of *P. tricornutum* cells to increasing doses of ethynylestradiol.

Supplemental Figure S4. Growth of *P. tricornutum* cells used for RNAseq analyses.

Supplemental Table S1. Whole-gene expression profiles following incubation of *P. tricornutum* cells with increasing doses of ethynylestradiol.

Supplemental Table S2. GOseq analysis of GO enrichment in *P. tricornutum* gene clusters differentially expressed following ethynylestradiol treatments.

Supplemental Table S3. Sterol metabolism gene expression following ethynylestradiol treatment.

Supplemental Table S4. Lipid gene expression following ethynylestradiol treatment.

Supplemental Table S5. Whole-gene expression profiles following incubation of *P. tricornutum* cells with increasing doses of ethynylestradiol.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Séverine Collin, Marie-Odile Fauvarque, Michel Ferrand, Giovanni Finazzi, and Dimitris Petroutsos for fruitful discussions and advice.

Received December 22, 2017; accepted March 6, 2018; published March 13, 2018.

LITERATURE CITED

- Abida H, Dolch LJ, Mei C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, et al (2015) Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* **167**: 118–136
- Adeel M, Song X, Wang Y, Francis D, Yang Y (2017) Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. *Environ Int* **99**: 107–119
- Ajjawi I, Verruto J, Aquí M, Soriaga LB, Coppersmith J, Kwok K, Peach L, Orchard E, Kalb R, Xu W, et al (2017) Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. *Nat Biotechnol* **35**: 647–652
- Alipanah L, Rohloff J, Winge P, Bones AM, Brembu T (2015) Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot* **66**: 6281–6296
- Allouret G, Courtois F, Chevalier F, Lerbs-Mache S (2013) Plastid gene expression during chloroplast differentiation and dedifferentiation into non-photosynthetic plastids during seed formation. *Plant Mol Biol* **82**: 59–70
- Anandarajah K, Mahendrapuram G, Sommerfeld M, Hu Q (2012) Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp mutants for improved production of biofuels. *Appl Energy* **96**: 371–377
- Arbenz A, Perrin R, Avérous L (2018) Elaboration and properties of innovative biobased PUIR foams from microalgae. *J Polym Environ* **26**: 254–262
- Aris AZ, Shamsuddin AS, Praveena SM (2014) Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ Int* **69**: 104–119
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, et al (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306**: 79–86
- Attwood D (1976) Aggregation of antiacetylcholine drugs in aqueous solution: micellar properties of some diphenylmethane derivatives. *J Pharm Pharmacol* **28**: 407–409
- Baas PW, Rao AN, Matamoros AJ, Leo L (2016) Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskeleton (Hoboken)* **73**: 442–460
- Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, Reszka AA, Rodan G (2000) Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys* **373**: 231–241
- Bhandari RK, Deem SL, Holliday DK, Jandegian CM, Kassotis CD, Nagel SC, Tillitt DE, Vom Saal FS, Rosenfeld CS (2015) Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethynyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *Gen Comp Endocrinol* **214**: 195–219
- Blagosklonny MV (2003) A new science-business paradigm in anticancer drug development. *Trends Biotechnol* **21**: 103–106
- Botté CY, Maréchal E (2014) Plastids with or without galactoglycerolipids. *Trends Plant Sci* **19**: 71–78
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otilar RP, et al (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**: 239–244
- Bozarth A, Maier UG, Zauner S (2009) Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**: 195–201
- Brodie J, Chan CX, De Clerck O, Cock JM, Coelho SM, Gachon C, Grossman AR, Mock T, Raven JA, Smith AG, et al (2017) The algal revolution. *Trends Plant Sci* **22**: 726–738
- Butler WL, Kitajima M (1975) Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **376**: 116–125
- Camell CD, Sander J, Spadaro O, Lee A, Nguyen KY, Wing A, Goldberg EL, Youm YH, Brown CW, Elsworth J, et al (2017) Inflammation-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature* **550**: 119–123
- Chen CS, Jounaidi Y, Waxman DJ (2005) Enantioselective metabolism and cytotoxicity of R-ifosfamide and S-ifosfamide by tumor cell-expressed cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* **33**: 1261–1267
- Chen X, Ji ZL, Chen YZ (2002) TTD: Therapeutic Target Database. *Nucleic Acids Res* **30**: 412–415
- Chesné C, Guyomard C, Guillouzo A, Schmid J, Ludwig E, Sauter T (1998) Metabolism of meloxicam in human liver involves cytochromes P450C9 and 3A4. *Xenobiotica* **28**: 1–13
- Chisti Y (2013) Constraints to commercialization of algal fuels. *J Biotechnol* **167**: 201–214
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156–159
- Coelho AM, Jacob L, Fioramonti J, Bueno L (2001) Rectal antinociceptive properties of alverine citrate are linked to antagonism at the 5-HT1A receptor subtype. *J Pharm Pharmacol* **53**: 1419–1426
- Coleman DT, Gray AL, Stephens CA, Scott ML, Cardelli JA (2016) Repurposed drug screen identifies cardiac glycosides as inhibitors of TGF- β -induced cancer-associated fibroblast differentiation. *Oncotarget* **7**: 32200–32209
- Corteggiani Carpinelli E, Telatin A, Vitulo N, Forcato C, D'Angelo M, Schiavon R, Vezzi A, Giacometti GM, Morosinotto T, Valle G (2014) Chromosome scale genome assembly and transcriptome profiling of *Nannochloropsis gaditana* in nitrogen depletion. *Mol Plant* **7**: 323–335
- Cvejić JH, Rohmer M (2000) CO₂ as main carbon source for isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate route in the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzschia ovalis*. *Phytochemistry* **53**: 21–28
- Daboussi F, Leduc S, Maréchal A, Dubois G, Guyot V, Perez-Michaut C, Amato A, Falciatore A, Juillerat A, Beurdeley M, et al (2014) Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nat Commun* **5**: 3831
- De Riso V, Raniello R, Maumus F, Rogato A, Bowler C, Falciatore A (2009) Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Res* **37**: e96
- Deschamps P, Moreira D (2012) Reevaluating the green contribution to diatom genomes. *Genome Biol Evol* **4**: 683–688
- d'Ippolito G, Sardo A, Paris D, Vella FM, Adelfi MG, Botte P, Gallo C, Fontana A (2015) Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. *Biotechnol Biofuels* **8**: 28
- Dolch LJ, Lupette J, Tourcier G, Bedhomme M, Collin S, Magneschi L, Conte M, Seddiki K, Richard C, Corre E, et al (2017a) Nitric oxide mediates nitrite-sensing and adaptation and triggers a remodeling of lipids. *Plant Physiol* **175**: 1407–1423
- Dolch LJ, Maréchal E (2015) Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Drugs* **13**: 1317–1339

- Dolch LJ, Rak C, Perin G, Tourcier G, Broughton R, Leterrier M, Morosinotto T, Tellier F, Faure JD, Falconet D, et al (2017b) A palmitic acid elongase affects eicosapentaenoic acid and plastidial monogalactosyldiacylglycerol levels in *Nannochloropsis*. *Plant Physiol* **173**: 742–759
- Fabris M, Matthijs M, Carbonelle S, Moses T, Pollier J, Dasseville R, Baart GJ, Vyverman W, Goossens A (2014) Tracking the sterol biosynthesis pathway of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *New Phytol* **204**: 521–535
- Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C (1999) Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. *Mar Biotechnol* (NY) **1**: 239–251
- Falciatore A, d'Alcalà MR, Croot P, Bowler C (2000) Perception of environmental signals by a marine diatom. *Science* **288**: 2363–2366
- Flori S, Jouneau PH, Finazzi G, Maréchal E, Falconet D (2016) Ultrastructure of the periplastidial compartment of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Protist* **167**: 254–267
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D (2010) cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* **62**: 525–563
- Franz AK, Danielewicz MA, Wong DM, Anderson LA, Boothe JR (2013) Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity. *ACS Chem Biol* **8**: 1053–1062
- Fukaya N, Mochizuki K, Tanaka Y, Kumazawa T, Jiuxin Z, Fuchigami M, Goda T (2009) The alpha-glucosidase inhibitor miglitol delays the development of diabetes and dysfunctional insulin secretion in pancreatic beta-cells in OLETF rats. *Eur J Pharmacol* **624**: 51–57
- Furlanet M, Franceschi L (2003) Pharmacology of ifosfamide. *Oncology* (Suppl 2) **65**: 2–6
- Gallo C, d'Ippolito G, Nuzzo G, Sardo A, Fontana A (2017) Autoinhibitory sterol sulfates mediate programmed cell death in a bloom-forming marine diatom. *Nat Commun* **8**: 1292
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, et al (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498–511
- Georgakopoulos ND, Wells G, Campanella M (2017) The pharmacological regulation of cellular mitophagy. *Nat Chem Biol* **13**: 136–146
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008) Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 491–517
- Haenisch B, Walstab J, Herberhold S, Bootz F, Tschalkin M, Ramseger R, Bönisch H (2010) Alpha-adrenoceptor agonistic activity of oxymetazoline and xylometazoline. *Fundam Clin Pharmacol* **24**: 729–739
- Haggarty SJ, Mayer TU, Miyamoto DT, Fathi R, King RW, Mitchison TJ, Schreiber SL (2000) Dissecting cellular processes using small molecules: identification of colchicine-like, taxol-like and other small molecules that perturb mitosis. *Chem Biol* **7**: 275–286
- Haraguchi K, Ito K, Kotaki H, Sawada Y, Iga T (1997) Prediction of drug-induced catalepsy based on dopamine D1, D2, and muscarinic acetylcholine receptor occupancies. *Drug Metab Dispos* **25**: 675–684
- Huang XP, Williams FE, Peseckis SM, Messer WS Jr (1998) Pharmacological characterization of human m1 muscarinic acetylcholine receptors with double mutations at the junction of TM VI and the third extracellular domain. *J Pharmacol Exp Ther* **286**: 1129–1139
- Imming P, Sinning C, Meyer A (2006) Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 821–834
- Inhoffen HH, Hohlweg W (1938) Neue per os-wirksame weibliche Keimdrüsenhormon-Derivate: 17-Aethinyl-oestradiol und Pregnen-in-on-3-ol-17. *Naturwissenschaften* **26**: 96
- Jensen EV, DeSombre ER (1973) Estrogen-receptor interaction. *Science* **182**: 126–134
- Jeong DE, Song HJ, Lim S, Lee SJ, Lim JE, Nam DH, Joo KM, Jeong BC, Jeon SS, Choi HY, et al (2015) Repurposing the anti-malarial drug artesunate as a novel therapeutic agent for metastatic renal cell carcinoma due to its attenuation of tumor growth, metastasis, and angiogenesis. *Oncotarget* **6**: 33046–33064
- Johnson X, Vandystadt G, Bujaldon S, Wollman FA, Dubois R, Roussel P, Alric J, Béal D (2009) A new setup for in vivo fluorescence imaging of photosynthetic activity. *Photosynth Res* **102**: 85–93
- Keeling PJ (2009) Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. *J Eukaryot Microbiol* **56**: 1–8
- Kilian O, Benemann CS, Niyogi KK, Vick B (2011) High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 21265–21269
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12**: 357–360
- Kim J, Brown CM, Kim MK, Burrows EH, Bach S, Lun DS, Falkowski PG (2017) Effect of cell cycle arrest on intermediate metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**: E8007–E8016
- Klein-Marcuschamer D, Chisti Y, Benemann JR, Lewis D (2013) A matter of detail: assessing the true potential of microalgal biofuels. *Biotechnol Bioeng* **110**: 2317–2322
- Kutschera U, Niklas KJ (2005) Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci* **124**: 1–24
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**: R25
- Larsen M, Holm R, Jensen KG, Sveigaard C, Brodin B, Nielsen CU (2010) 5-Hydroxy-L-tryptophan alters gaboxadol pharmacokinetics in rats: involvement of PAT1 and rOat1 in gaboxadol absorption and elimination. *Eur J Pharm Sci* **39**: 68–75
- Levitano O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG (2014) Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends Biotechnol* **32**: 117–124
- Levitano O, Dinamarca J, Zelzion E, Lun DS, Guerra LT, Kim MK, Kim J, Van Mooy BA, Bhattacharya D, Falkowski PG (2015) Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 412–417
- Li B, Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**: 323
- Liao JC, Mi L, Pontrelli S, Luo S (2016) Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nat Rev Microbiol* **14**: 288–304
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**: 3–26
- Liu L, Zhang R, Zhao JJ, Rogers JD, Hsieh JY, Fang W, Matuszewski BK, Dobrinska MR (2003) Determination of simvastatin-derived HMG-CoA reductase inhibitors in biomatrices using an automated enzyme inhibition assay with radioactivity detection. *J Pharm Biomed Anal* **32**: 107–123
- Liu T, Zhang S, Chen J, Jiang K, Zhang Q, Guo K, Liu Y (2014) The transcriptional profiling of glycogenes associated with hepatocellular carcinoma metastasis. *PLoS ONE* **9**: e107941
- Liu Y, Guan Y, Gao Q, Tam NF, Zhu W (2010) Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. *Chemosphere* **80**: 592–599
- Liu Y, Tam NFY, Guan YT, Gao BY (2012) Influence of a marine diatom on the embryonic toxicity of 17 alpha-ethynylestradiol to the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Water Air Soil Pollut* **223**: 4383–4395
- Lupette J, Maréchal E (2018) Phytoplankton glycerolipids, challenging but promising prospects from biomedicine to green chemistry and biofuels. *In* S La Barre, SS Bates, eds, *Blue Technologies: Production and Use of Marine Molecules*. Wiley VCH, Weinheim, Germany, pp. 191–215
- Maeda Y, Nojima D, Yoshino T, Tanaka T (2017) Structure and properties of oil bodies in diatoms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **372**: 20160408
- Maier UG, Douglas SE, Cavalier-Smith T (2000) The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes. *Protist* **151**: 103–109
- Mainardi JL, Villet R, Bugg TD, Mayer C, Arthur M (2008) Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 386–408
- Maréchal E (2008) Chemogenomics: a discipline at the crossroad of high throughput technologies, biomarker research, combinatorial chemistry, genomics, cheminformatics, bioinformatics and artificial intelligence. *Comb Chem High Throughput Screen* **11**: 582
- Marechal E (2009) In silico strategies for target discovery. *Infect Genet Evol* **9**: 370–371
- Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ (1999) Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* **286**: 971–974
- McFadden GI (1999) Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 513–519
- Mei CE, Cussac M, Haslam RP, Beaudoin F, Wong YS, Marechal E, Rébeillé F (2017) C1 metabolism inhibition and nitrogen deprivation

- trigger triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* cell cultures and highlight a role of NPC in phosphatidylcholine-to-triacylglycerol pathway. *Front Plant Sci* 7: 2014
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L, et al** (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245–250
- Misra AN, Misra M, Singh R** (2012) Chlorophyll fluorescence in plant biology. In AN Misra, ed, *Biophysics*. InTech, pp 171–192
- Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen MT, Mannon R, Koller BH, Coffman TM** (2001) Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 108: 1229–1235
- Nymark M, Sharma AK, Sparstad T, Bones AM, Winge P** (2016) A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Sci Rep* 6: 24951
- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL** (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5: 993–996
- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C** (2006) Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 58: 87–114
- Panara MR, Renda G, Sciuilli MG, Santini G, Di Giamberardino M, Rotonondo MT, Tacconelli S, Seta F, Patrono C, Patrignani P** (1999) Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 276–280
- Pawłowski L, Siwanowicz J, Bigajska K, Przegaliński E** (1985) Central antiserotonergic and antipaminergic action of pirenperone, a putative 5-HT₂ receptor antagonist. *Pol J Pharmacol Pharm* 37: 179–196
- Petroutsos D, Amiar S, Abida H, Dolch LJ, Bastien O, Rébeillé F, Jouhet J, Falconet D, Block MA, McFadden GI, et al** (2014) Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways: from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Prog Lipid Res* 54: 68–85
- Pocock T, Falk S** (2014) Negative impact on growth and photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of the estrogen 17 α -ethynylestradiol. *PLoS ONE* 9: e109289
- Preissner S, Kroll K, Dunkel M, Senger C, Goldsobel G, Kuzman D, Guenther S, Winnenburg R, Schroeder M, Preissner R** (2010) SuperCYP: a comprehensive database on cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Res* 38: D237–D243
- Priddy AR, Killick SR, Elstein M, Morris J, Sullivan M, Patel L, Elder M** (1990) The effect of prostaglandin synthetase inhibitors on human pre-ovulatory follicular fluid prostaglandin, thromboxane, and leukotriene concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 235–242
- Prioretti L, Avilan L, Carriere F, Montane MH, Field B, Gregori G, Menand B, Gontero B** (2017) The inhibition of TOR in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* promotes a get-fat growth regime. *Algal Res* 26: 265–274
- Pulz O, Gross W** (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 635–648
- Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M** (2011) Serotonin receptors: from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res* 60: 15–25
- Qian H, Martin RJ, Robertson AP** (2006) Pharmacology of N-, L-, and B-subtypes of nematode nAChR resolved at the single-channel level in *Ascaris suum*. *FASEB J* 20: 2606–2608
- Riva E, Mennini T, Latini R** (1991) The alpha- and beta-adrenoceptor blocking activities of labetalol and its RR-SR (50:50) stereoisomers. *Br J Pharmacol* 104: 823–828
- Ruiz J, Olivieri G, de Vree J, Bosma R, Willems P, Reith JH, Eppink MHM, Kleinegris DMM, Wijffels RH, Barbosa MJ** (2016) Towards industrial products from microalgae. *Energy Environ Sci* 9: 3036–3043
- Sayanova O, Mimouni V, Ulmann L, Morant-Manceau A, Pasquet V, Schoefs B, Napier JA** (2017) Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372: 20160407
- Sayanova OV, Napier JA** (2004) Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochemistry* 65: 147–158
- Scaife MA, Smith AG** (2016) Towards developing algal synthetic biology. *Biochem Soc Trans* 44: 716–722
- Schudt C, Winder S, Eltze M, Kilian U, Beume R** (1991) Zardaverine: a cyclic AMP specific PDE III/IV inhibitor. *Agents Actions Suppl* 34: 379–402
- Shikanai T** (2014) Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* 26: 25–30
- Shteinikov VY, Korosteleva AS, Tikhonova TB, Potapieva NN, Tikhonov DB** (2017) Ligands of histamine receptors modulate acid-sensing ion channels. *Biochem Biophys Res Commun* 490: 1314–1318
- Siaut M, Heijde M, Mangogna M, Montsant A, Coesel S, Allen A, Manfredonia A, Falcitatore A, Bowler C** (2007) Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. *Gene* 406: 23–35
- Siegenthaler PF, Bain P, Riva F, Fent K** (2017) Effects of antiandrogenic progestins, chlormadinone and cyproterone acetate, and the estrogen 17 α -ethynylestradiol (EE2), and their mixtures: transactivation with human and rainbowfish hormone receptors and transcriptional effects in zebrafish (*Danio rerio*) eleuthero-embryos. *Aquat Toxicol* 182: 142–162
- Soleilhac E, Nadon R, Lafanechere L** (2010) High-content screening for the discovery of pharmacological compounds: advantages, challenges and potential benefits of recent technological developments. *Expert Opin Drug Discov* 5: 135–144
- Somuncu S, Cakmak M, Erdogan S, Caglayan O, Akman H, Kaya M** (2005) Trapidil, an inhibitor for phosphodiesterase and platelet-derived-growth factor, ameliorates corrosive esophageal burn in rats. *Tohoku J Exp Med* 207: 203–208
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A** (2006) Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101: 87–96
- Stoebe B, Maier UG** (2002) One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* 219: 123–130
- Tornio A, Pasanen MK, Laitila J, Neuvonen PJ, Backman JT** (2005) Comparison of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins) as inhibitors of cytochrome P450 2C8. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97: 104–108
- Totir MA, Helfand MS, Carey MP, Sheri A, Buynak JD, Bonomo RA, Carey PR** (2007) Sulbactam forms only minimal amounts of irreversible acrylate-enzyme with SHV-1 beta-lactamase. *Biochemistry* 46: 8980–8987
- Tricarico D, Mele A, Conte Camerino D** (2006) Carbonic anhydrase inhibitors ameliorate the symptoms of hypokalaemic periodic paralysis in rats by opening the muscular Ca²⁺-activated-K⁺ channels. *Neuromuscul Disord* 16: 39–45
- van den Meiracker AH, Man in't Veld AJ, Fischberg DJ, Molinoff PB, van Eck HJ, Boomsma F, Derckx FH, Schalekamp MA** (1988) Acute and long-term effects of acebutolol on systemic and renal hemodynamics, body fluid volumes, catecholamines, active renin, aldosterone, and lymphocyte beta-adrenoceptor density. *J Cardiovasc Pharmacol* 11: 413–423
- Varet H, Brillet-Guéguen L, Coppée JY, Dillies MA** (2016) SARTools: a DESeq2- and EdgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. *PLoS ONE* 11: e0157022
- Vieler A, Wu G, Tsai CH, Bullard B, Cornish AJ, Harvey C, Reza IB, Thornburg C, Achawanantakun R, Buehl CJ, et al** (2012) Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genet* 8: e1003064
- Walsky RL, Gaman EA, Obach RS** (2005) Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8. *J Clin Pharmacol* 45: 68–78
- Wang JK, Seibert M** (2017) Prospects for commercial production of diatoms. *Biotechnol Biofuels* 10: 16
- Warrilow AG, Martel CM, Parker JE, Melo N, Lamb DC, Nes WD, Kelly DE, Kelly SL** (2010) Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14-alpha demethylase (CaCYP51). *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4235–4245
- Wase N, Tu B, Allen JW, Black PN, DiRusso CC** (2017) Identification and metabolite profiling of chemical activators of lipid accumulation in green algae. *Plant Physiol* 174: 2146–2165
- Wase N, Tu B, Black PN, DiRusso CC** (2015) Phenotypic screening identifies brefeldin A/ascotoxin as an inducer of lipid storage in the algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res* 11: 74–84
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A** (2010) Gene Ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* 11: R14
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR** (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 4: 67–73
- Zhu BH, Shi HP, Yang GP, Lv NN, Yang M, Pan KH** (2016) Silencing UDP-glucose pyrophosphorylase gene in *Phaeodactylum tricornutum* affects carbon allocation. *New Biotechnol* 33: 237–244

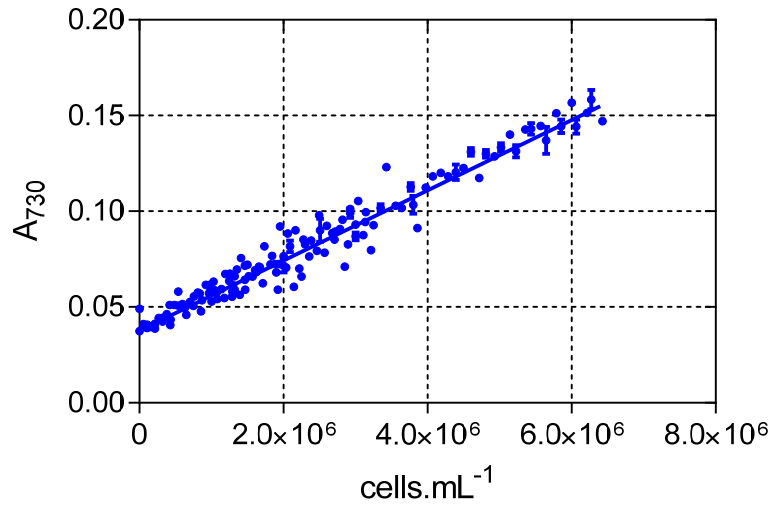
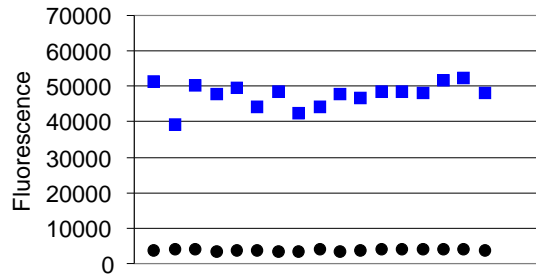
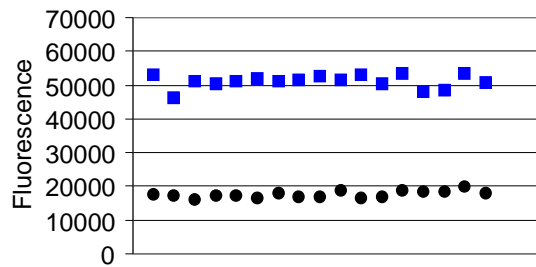


Figure S1. Measurement of *Phaeodactylum tricornutum* cell abundance. Cell concentrations were evaluated using a Malassez counting chamber in 140 independent experiments, using *Phaeodactylum* cultures grown in plates or in flasks, in ESAW containing or lacking nitrogen (ESAW 1N1P or 0N1P, respectively). In this compiled dataset, a linear correlation is detected with absorbance measured at 730 nm (A_{730}), with the following equation: $y = 1.834 \cdot 10^{-8} \cdot x + 0.03758$, with a correlation coefficient (R^2) of 0.9637.

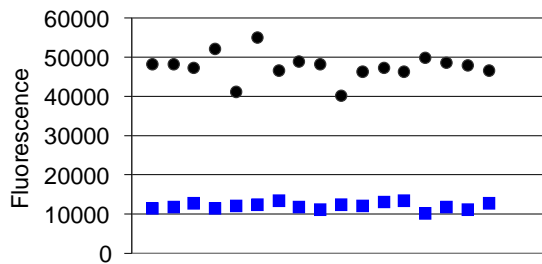
A. YFP fluorescence



B. Chlorophyll fluorescence



C. Nile red fluorescence



■ + Nitrogen (1N1P)
● - Nitrogen (0N1P)

Figure S2. Evaluation of miniature assay robustness. Parallel measures have been performed using *Phaeodactylum* cells in screening conditions, to assess the robustness of the parameters used to estimate **A, cell abundance** (Fluorescence of Histone H4 fused to YFP), **B chlorophyll** (fluorescence) and **C, triacylglycerol level** (Nile Red fluorescence). Cells were either grown in presence (1N1P) or absence (0N1P) of nitrogen. Low nitrogen condition is known to limit growth (low cell abundance), impact photosynthesis machinery (low chlorophyll level) and induce an accumulation of TAG (high Nile Red staining). Quality of the screening assay was assessed based on the calculation of $Z' = 1 - (3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-}) / |\mu_{c+} - \mu_{c-}|$; with σ_{c+} and σ_{c-} the standard deviation of readout values obtained with positive and negative controls, and μ_{c+} and μ_{c-} the means of readout values obtained with positive and negative controls i.e. high-TAG and low-TAG controls respectively. Z' factor for cell abundance measures (based on YFP fluorescence) was 0.75, Z' factor for TAG content (based on Nile Red fluorescence) was 0.64 and Z' factor for chlorophyll level was 0.73.

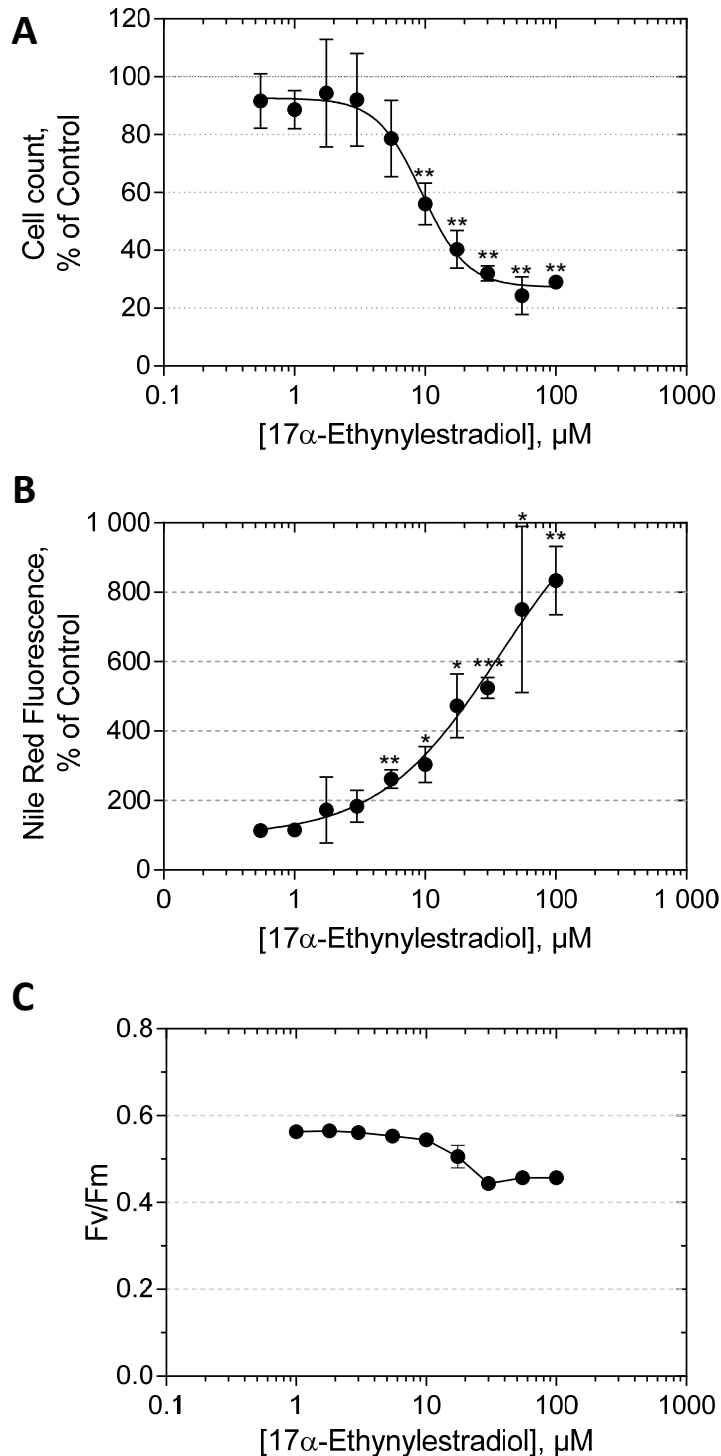


Figure S3. Response of *Phaeodactylum* cells to increasing doses of ethynylestradiol. A, Cell abundance. To control results obtained in dose-response assays, based on an estimate of cell abundance deduced from YFP fluorescence, the experiment was reproduced using cell counting with a Malassez counting chamber. **B, Nile Red Fluorescence.** Nile red fluorescence was quantified to indicate neutral lipid contents. **C. Photosystem II efficiency.** Fv/Fm was measured using fast chlorophyll fluorescence kinetics. Data are the average of independent triplicates. A t-test analysis was performed by comparing each data point to the untreated control: (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$. Error bars, standard deviation.

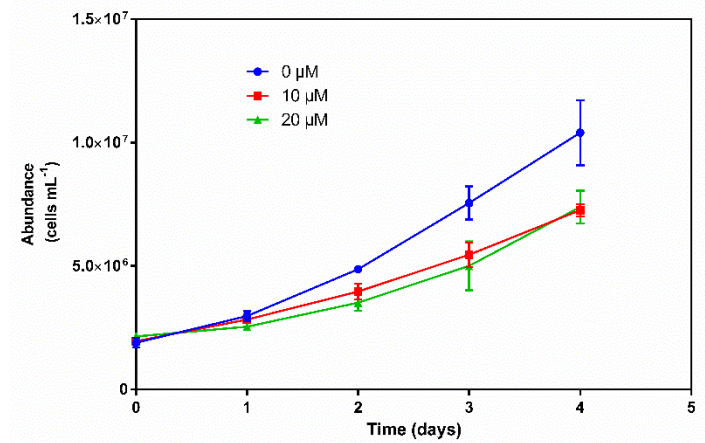


Figure S4. Growth of *Phaeodactylum* cells used for RNAseq analyses. Cells were grown in presence of Ethynylestradiol at the indicated concentration. To assess precisely the number of cells used for RNAseq analyses, cells were counted with a Malassez counting chamber. Data are the average of independent biological triplicates. Error bars, standard deviation.

Les Supplemental Tables (S1, S2, S3, S4 et S5) sont disponibles à l'adresse suivante :

<http://www.plantphysiol.org/content/177/2/532/tab-figures-data>

3. Étude de l'effet de l'épibrassinolide sur le métabolisme lipidique de *Phaeodactylum tricornutum*

3.1. Introduction

L'article 1 présente les effets du 17 α -éthynylestradiol sur la physiologie de *Phaeodactylum tricornutum*. Ce composé favorise l'accumulation de TAG en inhibant vraisemblablement la voie de synthèse des stérols. Cependant, le mécanisme d'action de ce composé est inconnu. La chimie du 17 α -éthynylestradiol est intéressante car de nombreuses homologies structurales existent avec des composés naturels tels que les brassinostéroïdes (**Figure 63**).

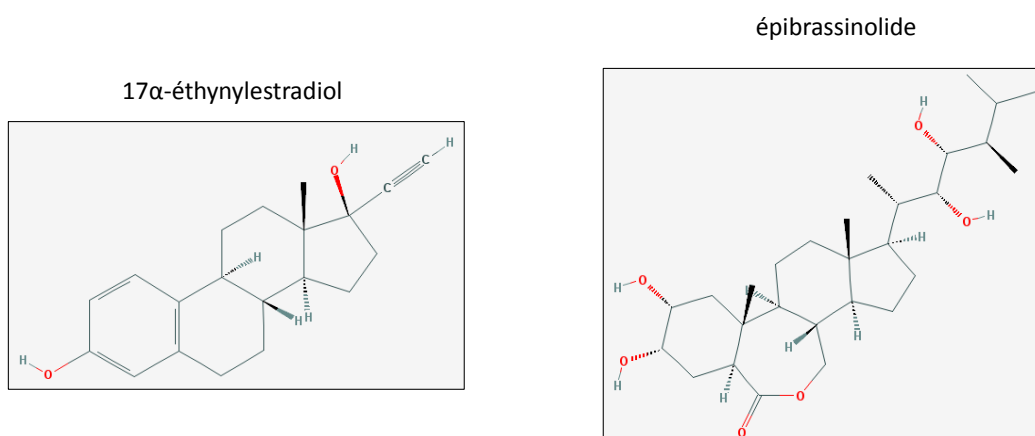


Figure 63 : Homologie structurale entre le 17 α -éthynylestradiol et l'épibrassinolide.

Les brassinostéroïdes sont des hormones végétales impliquées dans de nombreux processus fonctionnels tels que l'élongation cellulaire, la division et la régénération de la paroi cellulaire (Clouse & Sasse, 1998), l'élongation du pollen pour la formation du tube pollinique (Hewitt et al., 1985), la différenciation des faisceaux cribro-vasculaires (Caño-Delgado et al., 2004) et la réponse à certains stress (Clouse & Sasse, 1998). Ainsi, de par cette homologie structurale, nous avons émis l'hypothèse que le 17 α -éthynylestradiol pouvait se lier potentiellement à un récepteur aux brassinostéroïdes. Nous avons entrepris d'analyser les effets de l'épibrassinolide, un brassinostéroïde synthétisé chez de nombreux organismes photosynthétiques (Fedina et al., 2017).

3.2. Effet physiologique de l'épibrassinolide sur *Phaeodactylum*

Nous avons tout d'abord réalisé une étude physiologique de *Phaeodactylum* en présence de concentrations croissantes d'épibrassinolide (0,10 et 30 μ M). Nous avons choisi une gamme de concentration de l'ordre du micromolaire car les brassinostéroïdes agissent à très faible concentration (10^{-7} à 10^{-12} M) (Fedina et al., 2017). Après 4 jours, aucune différence significative n'a été observée en terme de croissance cellulaire entre les cellules témoins et les cellules traitées avec l'épibrassinolide (**Figure 64A**).

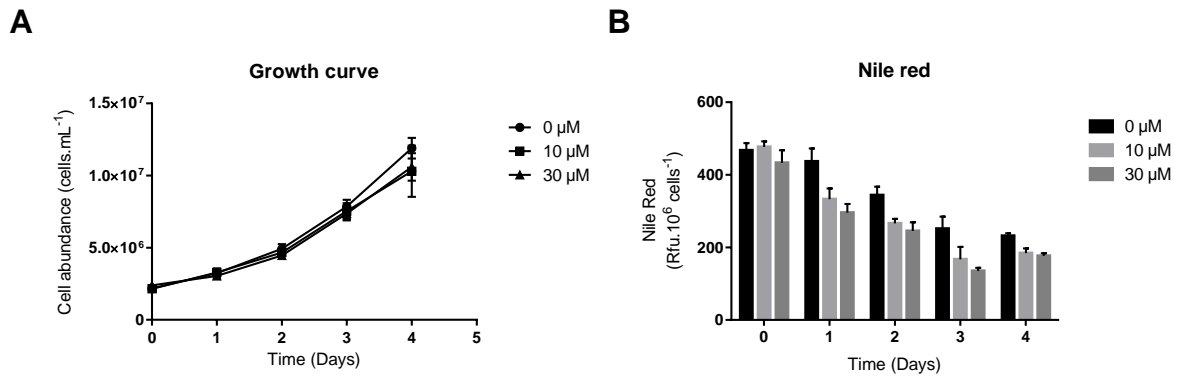


Figure 64 : Analyses physiologiques de *Phaeodactylum* en présence de doses croissantes d'épibrassinolide. Les analyses ont été réalisées pendant 4 jours avec 0, 10 et 30 µM d'épibrassinolide **A** : Concentration cellulaire mesurée via l'absorbance à 730 nm comme décrit dans Conte et al., 2018. **B** : **Évaluation de l'accumulation de lipides neutres par marquage au Rouge de Nil.** Les barres d'erreurs indiquent l'écart type par rapport à la moyenne (n=3).

En revanche, on observe une diminution significative de la coloration par le Rouge de Nil dès le premier jour de croissance en présence de 10 et 30 µM d'épibrassinolide (**Figure 64B**). Ces premiers résultats sont intéressants car l'effet est opposé de ce que l'on a observé avec le 17 α -éthynylestradiol (Conte et al., 2018). Peu de données existent chez les diatomées concernant l'effet de l'épibrassinolide. Une étude a été réalisée avec le 24-épibrassinolide, chez la diatomée *Asterionella formosa* (Mekhalfi et al., 2012). Cette étude présente une stimulation de la croissance cellulaire en présence de 0,1 µM de 24-épibrassinolide. Nous ne retrouvons pas cet effet chez *Phaeodactylum* avec 10 et 30 µM d'épibrassinolide.

Après 4 jours de culture, les cellules ont été centrifugées afin de pouvoir réaliser, en parallèle, une analyse lipidique des cellules traitées avec l'épibrassinolide ainsi qu'une étude transcriptomique afin de mettre en évidence les gènes dont l'expression est altérée entre les cellules contrôles et les cellules traitées. Un profil des acides gras totaux a tout d'abord été réalisé et les résultats sont présentés **Figure 65**.

Il n'y a quasiment pas de différence pour le profil des acides gras totaux, en dehors d'une augmentation significative (p-values < 5.10⁻²) des acides gras 16:0 après un traitement avec 30 µM d'épibrassinolide et d'une augmentation significative du C20:5 (p-values < 5.10⁻²) après un traitement avec 10 µM d'épibrassinolide. Ce profil diffère de ce que l'on peut observer en carence d'azote (Abida et al., 2015) ou en présence de 17 α -éthynylestradiol (Conte et al., 2018).

Nous avons réalisé ensuite une étude plus approfondie des glycérolipides (**Figure 66**). Le profil des glycérolides en fonction de la concentration d'épibrassinolide montre une augmentation significative (p-values < 10⁻⁴) de la proportion de MGDG après un traitement

avec 10 μM ($p\text{-value} < 5.10^{-3}$) et 30 μM ($p\text{-value} < 10^{-4}$) d'épibrassinolide (**Figure 66A**). Au niveau de la composition en acides gras du MGDG, les espèces moléculaires contenant du C16:3 augmentent quantitativement et semblent responsable de l'accumulation globale de MGDG observé. Une exception est à noter concernant le MGDG 20:5-16:3 qui diminue ($p\text{-value} < 1.10^{-3}$) (**Figure 66C**).

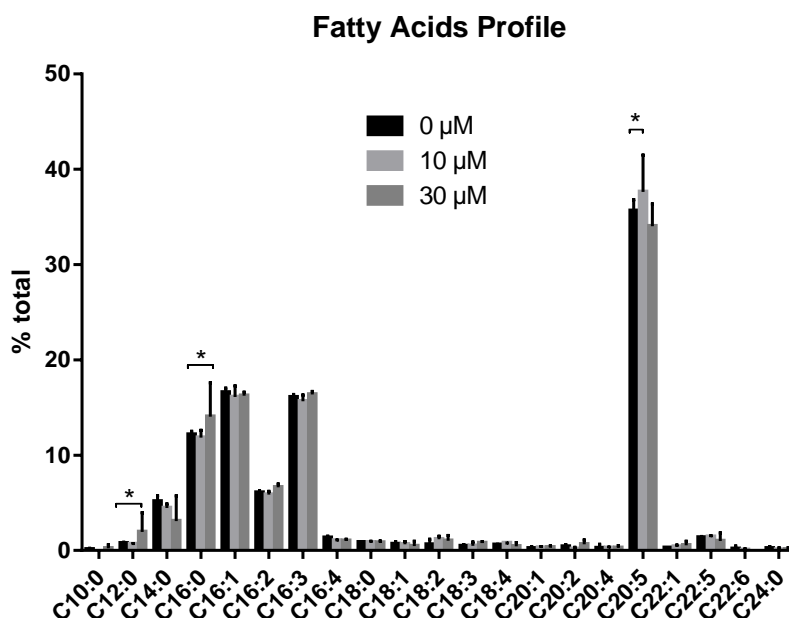


Figure 65 : Profil des acides gras totaux de *Phaeodactylum* traité avec des doses croissantes d'épibrassinolide. Les glycérolipides sont extraits et les acides gras totaux sont analysés, par séparation des méthyl-esters d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type par rapport à la moyenne ($n=3$). * : $p\text{-values} < 5.10^{-2}$ (ANOVA à deux facteurs).

Le profil des glycérolipides présente également une diminution significative de la PC après un traitement avec 30 μM d'épibrassinolide ($p\text{-value} < 10^{-4}$) (**Figure 57A**). De façon intéressante, le profil des acides gras de la PC présente une diminution pour les couples contenant du C20:5 alors que les autres espèces moléculaires contenant du C20:5 présentent une augmentation modérée. Une augmentation significative de la proportion d'acide eicosapentaénoïque (C20:5) a été détectée dans le profil des acides gras totaux de *Phaeodactylum* après traitement avec 10 μM d'épibrassinolide (**Figure 56**). À partir de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse d'un transfert du C20:5 de la PC vers le MGDG, le DGDG, et les TAG. Le DGTA constitue une plateforme de synthèse de l'EPA (Abida et al., 2015). L'ensemble des espèces moléculaires du DGTA contenant du C20:5 présentent également une augmentation modérée. L'épibrassinolide semble donc avoir un impact sur le métabolisme des VLC-PUFAs.

Concernant les TAG (**Figures 66A et 66B**), nous n'observons pas de variations significatives de la quantité de TAG pour des doses croissantes d'épibrassinolide, confirmant la non-accumulation de lipides neutres observées précédemment (**Figure 64B**). Nous confirmons, de surcroît, ce résultat par une analyse TLC monodimensionnelle des lipides neutres de *Phaeodactylum* (**Figure 66B**). La composition des acides gras des TAG ne présente pas également de variation significative à l'exception des TAG 16:0-16:0-16:1. Cette différence peut notamment s'expliquer par une barre d'erreur importante entre les trois réplicats biologiques.

3.3. Conclusion et perspectives d'études

Ce paragraphe constitue une première étude des effets de l'épibrassinolide sur le métabolisme lipidique de *Phaeodactylum*. L'épibrassinolide semble réguler négativement la biosynthèse des TAG chez *Phaeodactylum*. En parallèle de l'analyse lipidique, une analyse transcriptomique en présence de 0, 10 et 30 μM d'épibrassinolide a été réalisée. Les analyses sont actuellement en cours, mais les premiers résultats semblent indiquer une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la production d'acétyl-CoA, des gènes de synthèse des TAG ainsi qu'une forte diminution d'expression de la Stramenopile Lipid Droplet Protein (Yoneda et al., 2016). En parallèle, une augmentation de la synthèse des TAG lipases est observée. Ces résultats préliminaires semblent donc confirmer l'analyse lipidique.

Phaeodactylum possède-t-il une voie de biosynthèse des brassinostéroïdes ? Comme nous l'avons évoqué précédemment, peu de données existent sur les brassinostéroïdes chez les diatomées (Mekhalfi et al., 2012). L'analyse transcriptomique met en évidence une légère diminution d'expression d'un homologue de Det-2 (De-etiolated 2 - Phatr3_J17044) lorsque *Phaeodactylum* est traité avec l'épibrassinolide. Chez les plantes, Det-2 est une enzyme en amont de la voie de synthèse des brassinostéroïdes agissant à deux niveaux : la conversion du campesterol en campestanol et la conversion du 22 α -hydroxycampesterol en 6-deoxocathasterone (Choe et al., 2001). Les intermédiaires de la voie de synthèse des brassinostéroïdes sont également des intermédiaires communs avec la biosynthèse des stérols menant au brassicastérol chez *Phaeodactylum* (Fabris et al., 2014). La détection de Det-2 dans le transcriptome suggère donc qu'une partie de la voie de synthèse des brassinostéroïdes est peut-être présente chez *Phaeodactylum*. La diminution d'expression de Det-2 en présence d'épibrassinolide pourrait suggérer qu'il existe un contrôle de la synthèse de brassinolide à travers un mécanisme d'inhibition par le produit.

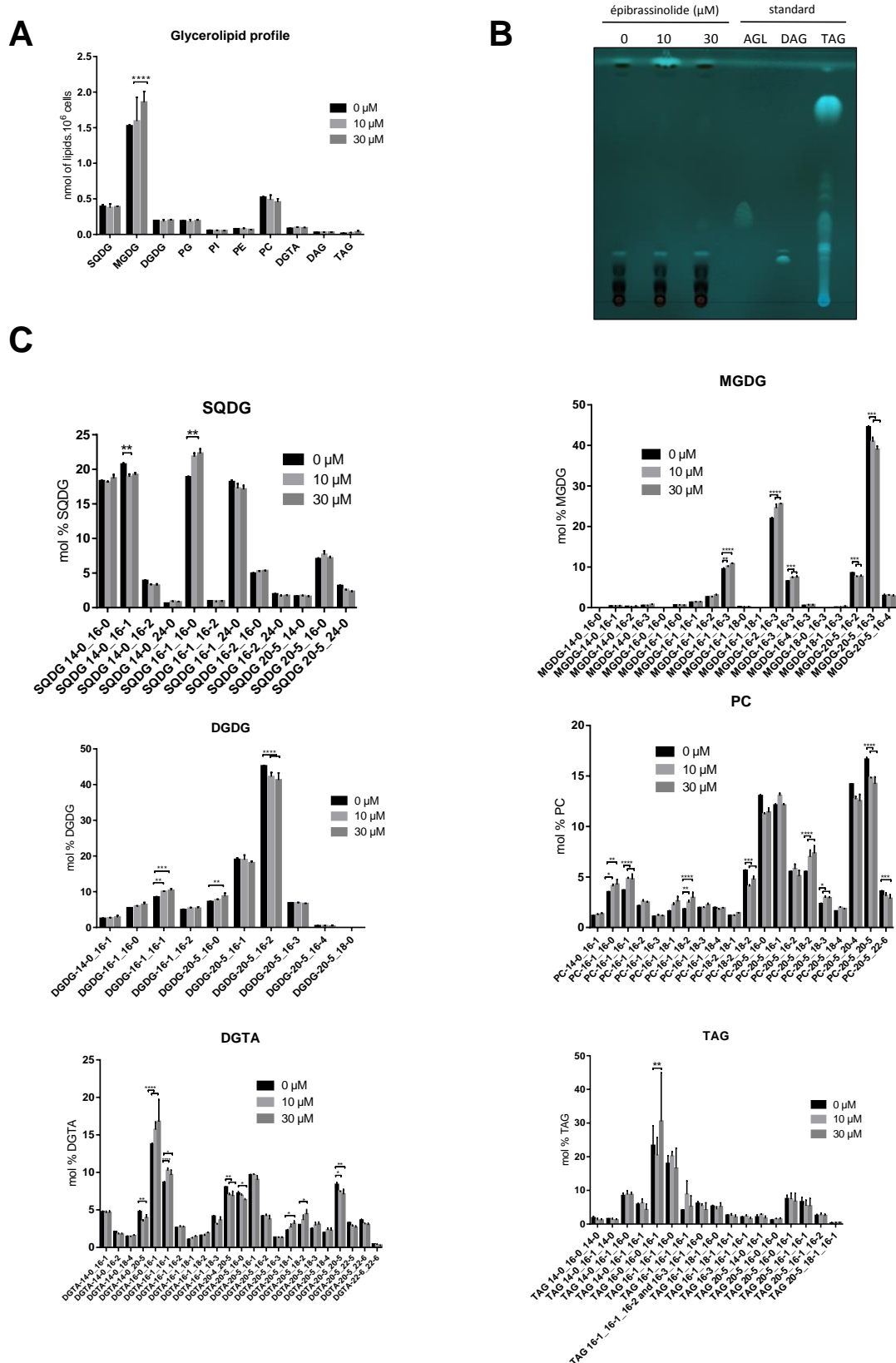


Figure 66 : Profil des glycérolipides après un traitement avec l'épibrassinolide. Les cellules de *Phaeodactylum tricornutum* ont été incubées dans du milieu ESAW 10N10P pendant 4 jours à une concentration cellulaire de 10^6 cellules mL^{-1} en présence ou en absence d'épibrassinolide. Les lipides ont été extraits et analysés comme décrit dans le

matériel et méthodes. **A : Profil des glycérolipides après un traitement avec 0, 10 et 30 μM d'épibrassinolide.** Les proportions de glycérolipides sont exprimées en mol %. **B : Chromatographie sur couche mince des lipides neutres après un traitement avec l'épibrassinolide.** AGL, acide gras libre ; DAG, diacylglycérol ; TAG, triacylglycérol. **C : Profil des acides gras des glycérolipides suivant un traitement avec 0, 10 et 30 μM d'épibrassinolide.** * : p-values < $5 \cdot 10^{-2}$, ** : p-values < $5 \cdot 10^{-3}$, *** : p-values < $1 \cdot 10^{-3}$ et **** : p-values < 10^{-4} (ANOVA à deux facteurs).

Le crible de petites molécules a également permis de mettre en évidence l'allopurinol comme une petite molécule pouvant favoriser l'accumulation de rouge de Nil en inhibant une xanthine oxydase (Pacher et al., 2006, Conte et al., 2018). La xanthine est une purine, c'est-à-dire qu'elle est composée d'un cycle pyrimidique fusionné à un cycle imidazole.

L'imidazole est connu pour être un inhibiteur de la stérol C-22 désaturase (Phatr3_J51757) permettant la conversion du campestérol en brassicastérol (Fabris et al., 2014). Une étude approfondie des effets de l'allopurinol sur la physiologie de *Phaeodactylum* constitue donc aussi un axe de recherche intéressant pour l'avenir.

Chapitre 2 :
Réévaluation des effets du
monoxyde d'azote
chez *Phaeodactylum tricornutum*

1. Préambule

L'azote constitue un nutriment majeur pour le développement des microalgues. Lorsqu'une carence en azote est réalisée, un arrêt de la croissance, une diminution de l'activité photosynthétique et une accumulation de TAG sont observés (Abida et al., 2015). À partir de la dégradation d'acides aminés, d'urée et d'autres composés azotés par le bacterioplancton, l'azote est rendu disponible sous forme de nitrite (NO_2^-), de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) dans l'environnement marin (Zehr & Ward, 2002). La concentration de ces composés est de l'ordre du micromolaire et dépendant de la profondeur (Sanz-Luque et al., 2015). Le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$) est un intermédiaire du cycle de l'azote impliqué dans un grand nombre de fonctions biologiques chez des organismes procaryote et eucaryote (Fowler et al., 2013). La concentration de monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$) est de l'ordre de 0,01 à 10 nM dans les océans (Zhang et al., 2006). Le $\text{NO}\cdot$ peut être synthétisé selon deux voies enzymatiques :

- 1) Une voie impliquant une Nitric Oxide Synthase (NOS) et utilisant la L-arginine comme substrat (Wilson et al., 2008).
- 2) Une voie impliquant une Nitrate Reductase (NR) et utilisant le nitrite comme substrat (Yamasaki and Sakihama, 2000, Stöhr et al., 2001, Rockel et al., 2002). Chez les plantes, cette voie est associée à la présence d'une NO--Associated protein (NOA) (Vardi et al., 2008, Moreau et al., 2008).

L'article 2 constitue une réévaluation des effets du $\text{NO}\cdot$ chez le modèle *Phaeodactylum tricornutum*. En effet, il avait été proposé que le $\text{NO}\cdot$ participait au contrôle des populations de diatomées, qui lorsqu'elles deviennent trop abondantes émettent un aldéhyde issu des acides gras polyinsaturés, le 2E,4E/Z-decadienal (DD) (Vardi et al., 2006, Vardi et al., 2008). Ces travaux semblaient démontrer que l'exposition de *Phaeodactylum* à de fortes concentrations de DD était responsable d'un pic de calcium cytoplasmique suivi de la synthèse de $\text{NO}\cdot$ coïncidant avec l'expression d'une protéine homologue de NOA et il avait été proposé que ce processus pouvait favoriser l'entrée dans un programme de mort cellulaire dépendant des caspases (Vardi et al., 2006, Vardi et al., 2008). Nous nous sommes intéressés à ce processus suite à l'analyse de petites molécules identifiées par criblage et induisant la production de TAG chez *Phaeodactylum* (article 1, Conte et al., 2018). Les composés en question sont des agents bloquant les phosphodiesterases (PDE), connues pour dégrader les nucléotides cycliques tels que le GMPc. Le $\text{NO}\cdot$ activant les enzymes de type guanylate cyclase, qui produisent le GMPc, nous avons supposé qu'il pouvait agir dans le même sens que les inhibiteurs de PDE, et donc induire une production de TAG. Nous avons donc repris les études publiées précédemment sur ce sujet. Il ne nous a pas été possible de reproduire l'effet du DD dans l'induction d'un programme de mort cellulaire dépendant du système caspase/métacaspase. Nous montrons que le $\text{NO}\cdot$ est responsable d'un arrêt de la croissance cellulaire et de l'accumulation de TAG

chez *Phaeodactylum*. Nous avons ensuite montré que la synthèse de NO \cdot était dépendante uniquement de la présence de nitrite comme substrat comme chez le modèle *Chlamydomonas* (Sakihama et al., 2002) et non par de l'arginine (Vardi et al., 2006, Vardi et al., 2008). De surcroît, des expérimentations antérieures suggéraient qu'une NO synthase (NOS) réalisait la synthèse de NO \cdot à partir d'arginine (Vardi et al., 2006). Cependant, aucune séquence correspondant à une NOS n'a été détectée dans le génome de *Phaeodactylum* (Di Dato et al., 2015).

L'article 2 se poursuit par l'étude de la lignée d'un surexprimeur NOA (NOAOE4). La surexpression de NOA chez *Phaeodactylum* est responsable d'une accumulation endogène de NO \cdot et de la transcription d'une Ferredoxin-Nitrite Reductase plastidiale (NIR, Phatr3_J12902). Nous avons montré que NOA n'était pas impliqué dans le mécanisme de réponse à la carence en azote. L'étude lipidomique du mutant NOAOE4 révèle un remodelage lipidique de *Phaeodactylum* avec une augmentation des TAG et une diminution du MGDG chloroplastique.

Une étude transcriptomique de *Phaeodactylum* sauvage en présence de 3 et 10 μ M de NO \cdot a été réalisée. Les variations observées d'expression génétique montrent, dans un premier temps, une augmentation de l'expression de la Straménopile Lipid Droplet Protein (StLDP, Phatr3_J48859), une protéine localisée à la surface de la gouttelette lipidique (Yoneda et al., 2016, Yoneda et al., 2018) ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes du complexe phosphoenolpyruvate déshydrogénase, alimentant le pool d'Acyl-CoA, et capable de servir à la synthèse de TAG à travers la voie de Kennedy. Le transcriptome révèle également une surexpression de la NIR et des gènes impliqués dans l'incorporation de l'ammonium en acides aminés à travers deux voies de synthèses :

- 1) la voie Glutamine Synthase/Glutamine OxoGlutarate AminoTransferase (GS/GOGAT) pour l'incorporation de l'ammonium en glutamine et glutamate.
- 2) la voie de l'ornithine-urée pour l'incorporation de l'ammonium en arginine et fumarate par une arginosuccinate lyase (ASL). L'excès de fumarate généré par l'activation de cette voie pouvait être dirigé vers le métabolisme carboné sous la forme d'acétyl-CoA.

Dans un second temps, par un marquage radioactif, nous avons observé une diminution de 50% de l'activité enzymatique des MGD synthases en présence de concentration croissante de NO \cdot indiquant que la diminution du MGDG dans le mutant NOAOE4 pouvait être en partie liée à une inhibition directe de l'activité enzymatique des MGD synthases.

Cette étude corrige donc une hypothèse quant au rôle du NO pour *Phaeodactylum*, vraisemblablement indépendant d'un système de contrôle des populations de diatomées, mais plutôt impliqué dans le *sensing* du nitrite par la nitrate synthase. Par ailleurs, cette étude révèle

que le NO peut induire la production de TAG par une reprogrammation génétique favorisant l'incorporation d'azote, conduisant aussi à la génération de fumarate, possiblement utilisé pour la biosynthèse d'acides gras, et par conséquent de TAGs. D'autres mécanismes conduisant à la production de TAG suite à l'exposition au NO⁻ ne sont pas exclues.

2. Article 2

Article 2 : Dolch*, L.J., **Lupette*, J.**, Tourcier, G., Bedhomme, M., Collin, S., Magneschi, L., Conte, M., Seddiki, K., Richard, C., Corre, E., Fourage, L., Laeuffer, F., Richards, R., Reith, M., Rébeillé, F., Jouhet, J., McGuinn, P., Maréchal, E. 2017. Nitric oxide mediates nitrite-sensing and adaptation and triggers a remodeling of glycerolipids in *Phaeodactylum*. **Plant Physiology**. 175: 1407-1423.

* : contribution égale

N.B: La numérotation des figures est ici indépendante du manuscrit de thèse.

Nitric Oxide Mediates Nitrite-Sensing and Acclimation and Triggers a Remodeling of Lipids¹

Lina-Juana Dolch,^{a,2} Josselin Lupette,^{a,2} Guillaume Tourcier,^a Mariette Bedhomme,^{a,b} Séverine Collin,^b Leonardo Magneschi,^a Melissa Conte,^a Khawla Seddiki,^a Christelle Richard,^a Erwan Corre,^c Laurent Fourage,^b Frédéric Laeuffer,^b Robert Richards,^d Michael Reith,^d Fabrice Rébeillé,^a Juliette Jouhet,^a Patrick McGinn,^d and Eric Maréchal^{a,3}

^aLaboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Unité mixte de recherche 5168 CNRS - CEA - INRA - Université Grenoble Alpes, Institut de Biosciences Biotechnologies de Grenoble, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054, Grenoble Cedex 9, France

^bTotal Refining Chemicals, Tour Michelet, 24 Cours Michelet - La Défense 10, 92069 Paris La Défense Cedex, France

^cStation Biologique de Roscoff, CNRS – Université Pierre et Marie Curie, Analyses and Bioinformatics for Marine Science, 29680 Roscoff, France

^dNational Research Council of Canada, Aquatic and Crop Resource Development, 1411 Oxford Street, Halifax, Nova Scotia B3H3Z1, Canada

ORCID IDs: 0000-0002-7842-575X (J.L.); 0000-0002-8140-4968 (G.T.); 0000-0002-0064-4872 (M.B.); 0000-0002-0060-1696 (E.M.).

Nitric oxide (NO) is an intermediate of the nitrogen cycle, an industrial pollutant, and a marker of climate change. NO also acts as a gaseous transmitter in a variety of biological processes. The impact of environmental NO needs to be addressed. In diatoms, a dominant phylum in phytoplankton, NO was reported to mediate programmed cell death in response to diatom-derived polyunsaturated aldehydes. Here, using the *Phaeodactylum* Pt1 strain, 2E,4E-decadienal supplied in the micromolar concentration range led to a nonspecific cell toxicity. We reexamined NO biosynthesis and response in *Phaeodactylum*. NO inhibits cell growth and triggers triacylglycerol (TAG) accumulation. Feeding experiments indicate that NO is not produced from Arg but via conversion of nitrite by the nitrate reductase. Genome-wide transcriptional analysis shows that NO up-regulates the expression of the plastid nitrite reductase and genes involved in the subsequent incorporation of ammonium into amino acids, via both Gln synthesis and Orn-urea pathway. The phosphoenolpyruvate dehydrogenase complex is also up-regulated, leading to the production of acetyl-CoA, which can feed TAG accumulation upon exposure to NO. Transcriptional reprogramming leading to higher TAG content is balanced with a decrease of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) in the plastid via posttranslational inhibition of MGDG synthase enzymatic activity by NO. Intracellular and transient NO emission acts therefore at the basis of a nitrite-sensing and acclimating system, whereas a long exposure to NO can additionally induce a redirection of carbon to neutral lipids and a stress response.

Nitric oxide (NO[•]) is an intermediate of the nitrogen (N) cycle (Fowler et al., 2013). This cycle is a complex network of reactions interconverting dinitrogen, the most abundant gas in the atmosphere, into gaseous nitrogen oxides, or NO_x (NO[•], nitrogen dioxide, NO₂, and nitrous gas), water soluble ions (ammonium, NH₄⁺; nitrite, NO₂⁻; and nitrate, NO₃⁻), organic molecules (from small soluble compounds like urea to proteins, lipids, and nucleic acids), and mineral forms (Holloway and Dahlgren, 2002; Fowler et al., 2013). NO[•] is an important pollutant in industrial flue gases (Vunjak-Novakovic et al., 2005; Zhu et al., 2015) and wastewaters (Kampschreur et al., 2009; Pan et al., 2015). All gases in the N cycle, including NO[•], are present in oceans (Zehr and Ward, 2002; Nicholls et al., 2007), either because of gas exchanges at the air-water interface (Nicholls et al., 2007) or because they are produced within oceans themselves. NO[•] is generated in seawater by nonbiological photochemical reactions (Olasehinde et al., 2010), large-scale electrical discharges

(Gallardo and Rhodes, 1997), and enzymatic activities in organisms living in the aerobic photic zone (Zhang et al., 2006; Olasehinde et al., 2010; Kumar et al., 2015; Eroglu et al., 2016) or in oxygen minimum zones (Naqvi et al., 1998; Nicholls et al., 2007; Martens-Habbena et al., 2015). Among the key biogeochemical cycles on which ecosystems depend for their sustainability, the N cycle is clearly the most perturbed by human activities (Fowler et al., 2013), marked by massive anthropogenic leakage of nitrate and ammonia from fertilized soils (Nicholls et al., 2007; Fowler et al., 2013) and by emissions of NO_x (Nicholls et al., 2007; IPCC, 2014; Michalski et al., 2014).

There are no reliable reports on NO[•] concentrations in aquatic ecosystems, because this reactive molecule has a lifetime of only a few seconds (Naqvi et al., 1998; Zehr and Ward, 2002; Zhang et al., 2006; Olasehinde et al., 2010). In natural seawater, NO[•] concentration has been estimated between 0.01 and 10 nM (Zhang et al., 2006). In industrial microalgae cultivation systems supplied with industrial flue gas (Vunjak-Novakovic et al., 2005),

we estimate that NO_x (including NO[•]) concentrations could reach the micro- to millimolar range, that is, one thousand- to one million-fold above the natural level. NO[•] diffuses freely, and even minor and transient variations could have high impacts on living organisms, in which NO[•] is also known to act as a signaling molecule.

NO[•] has been reported to act as a gasotransmitter in a plethora of biological functions in prokaryotes and eukaryotes, in nonphotosynthetic and photosynthetic cells, and in terrestrial or aquatic ecosystems (Wendehenne et al., 2001; Moreau et al., 2010; Kumar et al., 2015; Eroglu et al., 2016). Two major enzymatic pathways can produce NO[•] in aerobic conditions, via either a nitric oxide synthase (NOS) using Arg as a substrate (Wilson et al., 2008), or a nitrate reductase (NR) using nitrite as a substrate (Yamasaki and Sakihama, 2000; Stöhr et al., 2001; Rockel et al., 2002). The role of NO[•] in phytoplankton has been recently reviewed based on the available published data, showing that it could be synthesized in photosynthetic eukaryotes containing primary plastids (chlorophyta, rhodophyta) or secondary plastids (e.g. diatoms, haptophytes, etc.; Kumar et al., 2015).

In the green alga *Chlamydomonas*, nitrite is assumed to be the only NO[•] source, since the addition of Arg or the analog N ω -Nitro-L-Arg had no effect on its production (Sakihama et al., 2002). NO[•] was shown to act on nitrogen assimilation by repressing nitrate assimilation at two levels. Firstly, NO[•] represses the expression of the NR and the transporters of nitrate and ammonium (de Montaigu et al., 2010). Secondly, it directly regulates the activities of NR and nitrate and ammonium transporters in *Chlamydomonas* (Sanz-Luque et al., 2013). Following nitrogen depletion, NO[•] is produced from intracellular nitrite and operates in the specific cytochrome *b6f* degradation pathway (Wei et al., 2014). In *Chlamydomonas*, NO[•] appears therefore to have a dual role, repressing nitrogen assimilation and acting in response to nitrogen starvation. In other photosynthetic eukaryotes, NO[•] may

have opposite effects depending on the nitrogen status (Jin et al., 2009). To date, no clear scenario has arisen for a general model linking NO[•] signaling with the nitrogen status.

In the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, NO[•] has been proposed to act in population size control, being involved in a “stress surveillance system” upon exposure to high concentrations of the diatom-derived aldehyde 2E,4E/Z-decadienal (DD; Vardi et al., 2006; Vardi et al., 2008). The treatment of *Phaeodactylum* with micromolar concentrations of DD was reported to (1) induce a calcium spike followed by the synthesis of NO[•], (2) trigger the expression of the NO associated protein (NOA), coding for a homolog of a plant chloroplast protein involved in NO[•] production; and eventually (3) promote the entry into caspase-dependent programmed cell death (PCD; Vardi et al., 2006, 2008). The decrease in NO[•] produced by *Phaeodactylum* in the presence of an NOS-inhibitor led to the conclusion that NO[•] was produced by an NOS-like enzyme (Vardi et al., 2006), which seems contradictory with the absence of any NOS gene in the *Phaeodactylum* genome (Di Dato et al., 2015). NO[•] was therefore proposed to be derived from Arg and to act on the diatom itself, triggering PCD, and to diffuse outside the plasma membrane, spread rapidly through diatom population, triggering death in surrounding cells, eventually acting in the control of the population size (Vardi et al., 2008; Bidle, 2015).

Because climate change is marked by an increase in NO[•] emissions, the biological perturbations it could create on phytoplankton must be evaluated. *Phaeodactylum* appears as an appropriate model for this evaluation, firstly because the biosynthesis and physiological roles of NO[•] have been previously investigated (Vardi et al., 2006; Vardi et al., 2008) and secondly because some diatom strains have been considered for biotechnological applications, based on their neutral lipid content (Levitan et al., 2014; Abida et al., 2015). In this article, we analyzed the response of *Phaeodactylum* to various doses of NO[•] and found unanticipated results that led us to reexamine the pathway of NO[•] production by this diatom and the physiological responses this gasotransmitter could trigger.

RESULTS AND DISCUSSION

Treatment of *P. tricornutum* with DD Leads to Caspase/ Metacaspase-Independent Cell Death and Does Not Support a Role of NO in PCD

We started our study by setting up an experimental protocol previously reported to trigger PCD in *P. tricornutum*, in response to potent infochemicals deriving from disrupted diatoms cells (Vardi et al., 2006, 2008). Following wounding or nutrient stresses, diatom-derived polyunsaturated fatty acids are oxidized enzymatically into volatile polyunsaturated aldehydes (PUAs), including DD (Miralto et al., 1999). PUAs have been considered as potent interspecific and

¹ This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR DiaDomOil), CEA (Irtelis PhD grant program), the CEA-Total partnership, Programme Investissement d’Avenir (Océanomics), and the National Research Council of Canada’s Algal Carbon Conversion Program.

² These authors contributed equally to the article.

³ Address correspondence to eric.marechal@cea.fr.

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

L.-J.D. and J.L. performed most of the experiments; G.T. provided technical assistance for lipidomic profiling; M.B., L.M., M.C., J.L., and M.R. contributed to growth experiments in multiple devices and contributed to phenotypic analyses; L.-J.D., M.R., R.R., K.S., E.C., P.M., and E.M. contributed to whole genome transcriptomic analyses; R.R., K.S., and E.C. provided specific expertise in bioinformatics and bio-statistics; F.R. and J.J. provided specific expertise in glycerolipid analyses; L.-J.D., S.C., L.F., F.L., P.M., and E.M. participated in the conception of research plans; E.M. conceived the project; all the authors contributed to the writing of the article.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.17.01042

intraspecific signaling compounds (Casotti et al., 2005; Vardi et al., 2006). By treating *P. tricornutum* and *Thalassiosira weissflogii* with increasing doses of DD from 33 to 66 μM , a burst of NO' was measured using fluorophore 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate (DAF-FM) as a NO' -reporter, appearing within 5 min, with an intensity proportional to DD concentration (Vardi et al., 2006). Both DD and externally provided NO' were then reported to trigger PCD.

The concentration required to induce PCD was previously reported to be $>20 \mu\text{M}$, with DD solubilized in methanol at a final 1% concentration (Vardi et al., 2006). The role of DD as a cell-to-cell infochemical led us to consider that DD effects should not rely on any solvent, especially methanol that could promote loss of the volatile DD molecule at the air-water interface. We sought therefore to detect the effect of DD in the absence of methanol and after 3-h treatments to detect rapid responses. Previous studies have been performed using the *P. tricornutum* CCMP 632 strain (Vardi et al., 2006, 2008). Here, we used Pt1 8.6 (accessions CCAP1055/1 or CCMP 2561), isolated from the CCMP 632 strain, and now used as a main reference (De Martino et al., 2007; Bowler et al., 2008). We detected a far more sensitive effect after the addition of DD without methanol compared to the same treatments in presence of methanol. Growth was inhibited when DD was supplied at 3.3 μM without methanol, whereas growth was apparently unaffected when DD was solubilized in methanol (Supplemental Fig. S1A). The chlorophyll a fluorescence normalized to cell concentration decreased to one-half the value of untreated cells, 3 h after addition of 33 μM DD without methanol and after addition of $>100 \mu\text{M}$ DD in presence of methanol (Supplemental Fig. S1B). The F_v/F_m measure of PSII efficiency was one-half of that of untreated cells after addition of 3.3 μM DD in the absence of methanol, whereas a similar effect required 66 μM DD in presence of methanol (Supplemental Fig. S1C). Eventually, photochemical quenching capacity $Y(\text{II})$ was completely abolished after addition of 3.3 μM DD without methanol and after addition of 100 μM DD in presence of methanol (Supplemental Fig. S1D), indicating an interruption of electron transport to PSI. This functional disruption of photosynthesis could be due to a defect of components of the photosynthetic electron transport chain, like *cytf* or PSI, or of the Calvin cycle, or more simply to a non-specific effect of DD triggering membrane disruptions and leakage. Together, these results show that methanol decreases the impact of DD on *Phaeodactylum* (Supplemental Fig. S1; Supplemental Table S1), very likely by promoting its volatility. The sensitivity of *Phaeodactylum* to DD was therefore higher than previously observed (Vardi et al., 2006, 2008), and was consistent with susceptibilities reported for other phytoplankton including other diatoms, that is, *T. weissflogii* and *Skeletonema marinoi*, with half-lethal doses between 0.1 and 2.2 μM DD (Ribalet et al., 2007). In addition, whereas the caspase/metacaspase inhibitor carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone had been reported to partly

rescue *Phaeodactylum* treated with DD (Vardi et al., 2008), we could not detect any effect of carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone supplied at 20 μM on the impairment of F_v/F_m or $Y(\text{II})$ (Supplemental Fig. S1, E and F). These results are therefore consistent with the known nonspecific membrane-disrupting properties of PUAs (Casotti et al., 2005; Ribalet et al., 2007).

In *Phaeodactylum*, the cellular level of polyunsaturated fatty acids (mainly eicosapentaenoic acid) is about 2 nmol/ 10^6 cells in nutrient replete or nitrogen- or phosphorus-deprived media (Abida et al., 2015). Supposing that all eicosapentaenoic acid could be converted into PUAs, one should suppose that $1.65 \cdot 10^7$ to $3.3 \cdot 10^7$ *Phaeodactylum* cells per mL should be lysed to reach 33 and 66 μM PUAs (Vardi et al., 2006). The density of diatom cells required to reach micromolar concentrations of DD is therefore higher than that found in natural conditions, even after the formation of a bloom, with $<10^5$ cells/mL (Tiselius and Kuylenstierna, 1996). Consistently, the most recent survey of PUA levels in oceans shows that the highest concentration is in the nanomolar range (Ribalet et al., 2014). Thus, in our attempts to use DD as a physiological trigger of NO' , we could not confirm that it could act as a cell-to-cell specific signal in a submicromolar concentration range. Future works should therefore help clarify whether nanomolar concentrations of PUAs, without methanol, could effectively trigger any physiological response in *Phaeodactylum*.

The carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) reagent donates an oxygen atom to generate NO_2 and is often used to scavenge NO' and act as an antidote (Keszler et al., 2010). We sought whether DD-treated cells could be rescued by cPTIO, as previously reported (Vardi et al., 2008). Unexpectedly, *Phaeodactylum* cells proved to be sensitive to cPTIO, with more than one-third decrease of chlorophyll and a 20% decline in F_v/F_m after incubation with 100 μM cPTIO (dissolved in Enriched Seawater, Artificial Water [ESAW]; Supplemental Fig. S2; Supplemental Table S2). Therefore, cPTIO could be used neither to detect a possible involvement of NO' in DD response, nor to reverse any effect observed after NO' treatments. In addition, none of the NO' treatments reported in this study could suggest a role of NO in cell death.

A comparison of our study with previous works is summarized in Supplemental Tables S1 and S2. Taken together, we could not obtain results consistent with a specific DD \rightarrow NO' \rightarrow PCD cascade, but rather a caspase/metacaspase-independent nonspecific cell death triggered by high concentrations of DD. We reconsidered the question of the physiological role of NO' .

External Supply of NO' Impairs the Growth of *P. tricornutum*

We used two different methods for supplying NO' , either by providing NO' directly to the cells through the addition of an NO' -saturated solution or by adding a NO' -donor agent, S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP).

Nitroso-acetylpenicillamine (NAP), a structural analog of SNAP, which lacks the NO-moiety, was used as a control for SNAP experiments. We verified the production of NO' following SNAP dissolution by two methods. Firstly, using Membrane Inlet Mass Spectrometry (NRC Halifax Laboratories), we observed an increase of the NO' signal ($m/z = 30$) with increasing doses of SNAP, up to a concentration of 600 μM (Supplemental Fig. S3A). Secondly, using the DAF-FM probe, we detected a signal in <30 min following dilution (Supplemental Fig. S3B), showing the efficiency of this NO' donor in our experimental design. Both NO' donated by SNAP (Fig. 1A) or supplied directly as a gas (not shown) slowed down the growth of *Phaeodactylum*, as previously reported (Vardi et al., 2006, 2008). A concentration of 1 mM SNAP reduced growth by only 20% and was selected for further experiments. In contrast to DD, SNAP treatment did not affect chlorophyll levels (Fig. 1B).

External Supply of NO' Triggers the Accumulation of TAG within *P. tricornutum* Cells

Cell division arrest following general stress responses is known to coincide with the accumulation of TAG (Kohlwein, 2010; Meï et al., 2017). We analyzed the accumulation of TAG droplets in *Phaeodactylum* by Nile Red staining. Following exposure to NO', we did not see any evidence of chloroplast disintegration or of cell death. We observed that a 2-d incubation with 1 mM SNAP in a 500- μL culture volume triggered a 2.2-fold increase of TAG per cell (Fig. 2A) and a >2-fold increase of TAG productivity, corresponding to the level of TAG per volume of culture and per day (Fig. 2B). Interestingly, upon nitrogen starvation, two large lipid droplets become visible in *Phaeodactylum*, flanking the chloroplast (Abida et al., 2015); in SNAP-treated cells, numerous lipid droplets of variable sizes can be observed (Fig. 2C).

We sought to determine whether this effect observed following an external supply of NO' could be also attributed to NO' as an internal signal, enzymatically produced by the diatom itself. To that purpose, we reexamined the question of the endogenous production of NO'.

Biosynthesis of NO' in *Phaeodactylum* Is Arg Independent and Nitrite Dependent

Data from previous studies on NO' production in *Phaeodactylum* are confusing. On the one hand, it was shown that NO' production was dependent on Arg (Vardi et al., 2006) and authors concluded on the action of a NOS-like enzyme. Intriguingly, it was not possible to detect any NOS-like sequence in the genome of *P. tricornutum* (Di Dato et al., 2015).

On the other hand, an ortholog of the plant chloroplast NOA protein was identified (Vardi et al., 2008). In *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), AtNOA acts in NO' production, but the protein does not possess any NOS function (Moreau et al., 2008). AtNOA1 and NR are responsible for the majority of NO' release (Gas et al., 2009; Moreau et al., 2010). The mode of action of AtNOA1 remains elusive, although it might be involved in the regulation of NR activity (Jin et al., 2009; Mandal et al., 2012). In this NR-dependent pathway, NO' is produced by reduction of nitrite (NO_2^-) by NR (Fig. 3A). Nitrite is reduced to ammonia (NH_3) by the NIR, and ammonium is a substrate for the biosynthesis of Arg. Therefore, addition of Arg could have a negative feedback regulation on NIR, thereby providing high nitrite levels for NR-dependent NO' production (Fig. 3A). This could explain a positive action of an Arg supply on NO' production via NR and in the absence of any NOS. One way to make the distinction between NO' produced from Arg via a NOS or via a NR is to detect an inhibition of the NOS pathway by a blocking agent, for example, L-NAME (N ω -nitro-L-Arg methyl ester) in cofeeding experiments with Arg.

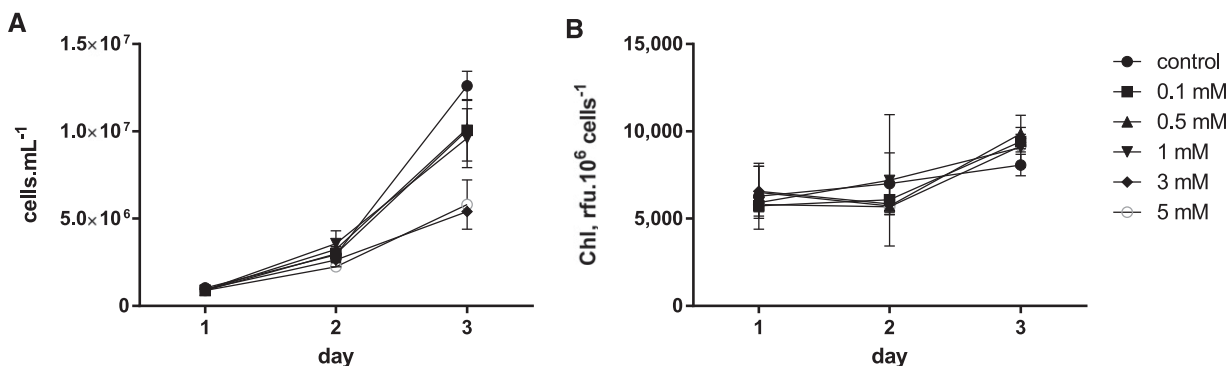


Figure 1. Effect of NO' supplied by SNAP on the growth of *Phaeodactylum*. The incubation was performed in a volume of 500 μL , inoculated at 10^6 cells \cdot mL⁻¹, with immediate addition of SNAP. A, Cell concentrations. Cell concentrations were estimated using a Malassez counting chamber. B, Chlorophyll content. Spectrophotometric measurement of fluorescence was performed at 680 nm at room temperature using 10^6 cells.

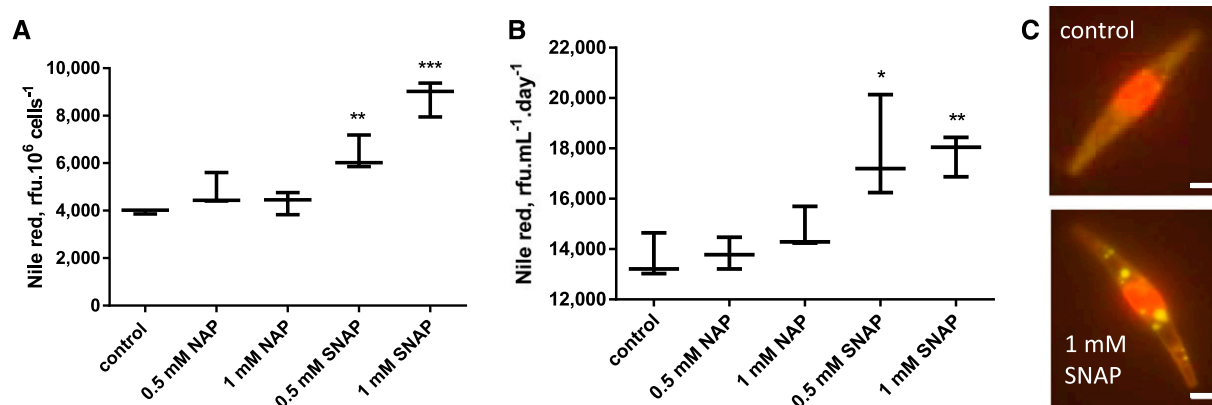


Figure 2. Effect of increasing concentrations of SNAP on the production of TAG in *P. tricornutum*. The incubation was performed in a volume of 500 μL , inoculated at 10^6 cells \cdot mL⁻¹, with immediate addition of chemicals. Measurements were performed after 2 d of incubation. A, Effect of increasing concentrations of SNAP on TAG level per cell. TAG level per cell were measured using Nile Red staining and is given in relative fluorescence units per 10^6 cells. Stars indicate statistical relevant treated compared to untreated samples, with P values of $5 \cdot 10^{-3}$ and $4 \cdot 10^{-4}$ for 0.5 mM SNAP and 1 mM SNAP, respectively. B, Effect of increasing concentrations of SNAP on TAG productivity. TAG productivity is given in Rfu corresponding to the fluorescence of Nile Red per milliliter and per day. Statistically relevant responses are indicated by stars after treatments with 0.5 mM SNAP (P value $3 \cdot 10^{-2}$) and 1 mM SNAP (P value $4 \cdot 10^{-4}$). C, Epifluorescence images of Nile red stained treated and untreated cells. Bar, 5 μm .

We therefore analyzed the endogenous level of NO[•] in *Phaeodactylum* culture in presence of the two potential substrates, Arg and NO₂⁻. The detection of NO[•] in *Phaeodactylum* was much higher when the diatoms were cultured in presence of NO₂⁻, either in the presence or absence of NO₃⁻ (Fig. 3B), supporting a production via NR. By contrast, addition of Arg did not impact on the production of NO[•]. Similarly, addition of L-NAME did not lead to any significant change, when cells were cofed with Arg (Fig. 3B; Supplemental Table S2).

Taken together, our results are consistent with the absence of any NOS activity and with the presence of a unique NR-dependent production of NO[•] in *Phaeodactylum*. This NR-dependent pathway is conserved in photosynthetic eukaryotes from distant clades, such as Arabidopsis (Moreau et al., 2010; Sanz-Luque et al., 2015), the red alga *Gracilaria chilensis* (Chow et al., 2013), and the green alga *Chlamydomonas* (Wei et al., 2014).

NOA Overexpression Correlates with an Increased Endogenous Production of NO[•] by *Phaeodactylum*

We reexamined the role of the NOA protein in the endogenous production of NO[•] and designed genetic constructs for NOA overexpression. Genomic DNA extracted from *P. tricornutum* Pt1 strain was used as substrate, and a 2,352-bp sequence was amplified by PCR using oligonucleotides designed from Phatr2_56150 (Vardi et al., 2008), now referenced as Phatr3_J40200. The NOA PCR product was cloned into the pH4 vector (De Riso et al., 2009), transformed into *P. tricornutum* wild-type cells, and we obtained overexpressing lines following resistance to Zeocin selection, including NOAOE4 and NOAOEf generated by two independent series of

transformation experiments. The RNA level of the NOA gene was more than 30-fold induced in the two independent overexpressing lines and led to an elevated NO[•] production (Supplemental Fig. S4), which was consistent with previous reports (Vardi et al., 2008). We thus confirmed that NOA played a role in NO[•] production and used these overexpressing lines as models for the analysis of the physiological role of NO[•] in *Phaeodactylum*. We obtained similar results with both independent overexpressing lines and present below the results obtained with NOAOE4.

NOA Overexpression Activates the Transcription of the Plastid Ferredoxin-Nitrite Reductase

In plants, the precise molecular function of NOA is unresolved, but some reports suggest an interplay with nitrogen assimilation (Yamasaki and Sakihama, 2000; Moreau et al., 2010). NO[•] production was also correlated with a transcriptional control of nitrogen assimilation genes, as described for *Chlamydomonas* (de Montaigu et al., 2010). We sought whether such transcriptional control could exist in *Phaeodactylum*. We analyzed by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) the expression level of the genes coding for the cytosolic NR (Phatr3_J54983), the plastid ferredoxin-dependent nitrite reductase, NIR (Phatr3_J12902), and the sulfite reductase SIR (Phatr3_J9538), used as a nitrogen-independent negative control. In nutrient-replete conditions (10 \times ESAW), the NIR gene was highly induced in NOAOE4, whereas NR expression was slightly increased and that of SIR did not change significantly, compared to the respective wild type and cells transformed with the empty vector (Fig. 4A). A nitrite-sensing module can therefore be proposed based on

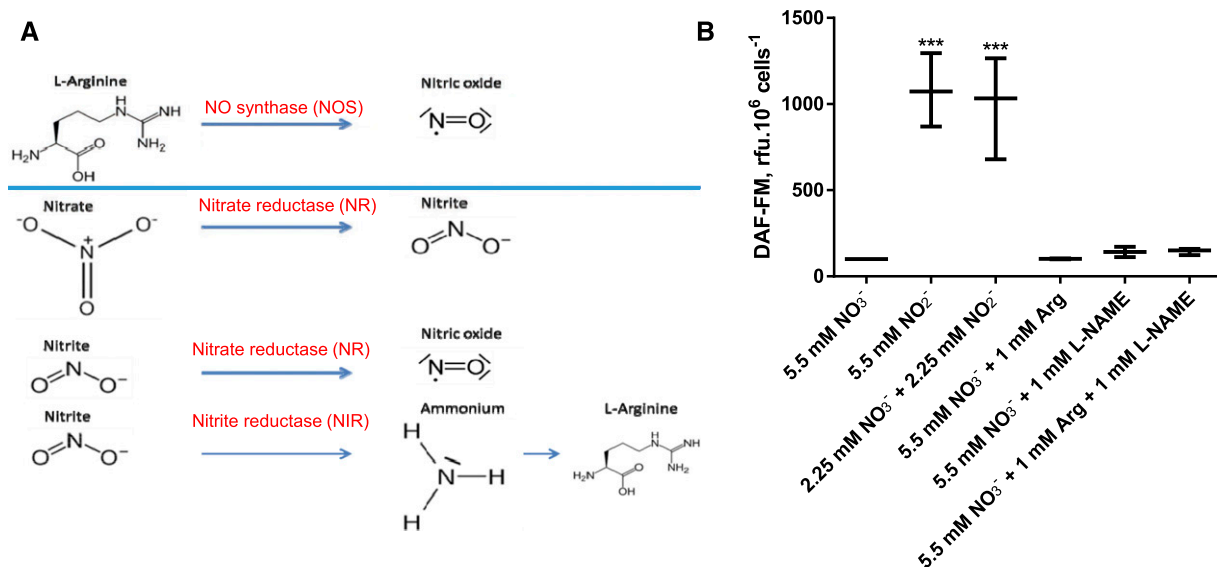


Figure 3. Biosynthesis of NO^{\bullet} in *Phaeodactylum* is Arg-independent and nitrite dependent. A, Different pathways for NO^{\bullet} production in microorganisms. Two general pathways exist in aerobic conditions, either by a NOS pathway using Arg as substrate (top) or by a side activity of NR using nitrite as substrate (bottom). Nitrite reduction generates ammonium, which can be incorporated into amino acids, including Arg (lowest reactions). It is thus possible that a supply of Arg exerts a negative feedback, leading to nitrite accumulation and a NR-dependent production of NO^{\bullet} . B, Detection of NO^{\bullet} in *Phaeodactylum* based on nitrogen sources. Cells were harvested from complete media and inoculated in nitrogen-free media at 2.10^6 cells \cdot mL $^{-1}$. DAF-FM was added at a concentration of $10 \mu\text{M}$. After dark incubation and washing, cells were collected into 500- μL culture aliquots and supplemented with the indicated nitrogen sources: nitrate (NO_3^- , standard medium), nitrite (NO_2^-), 1 mM Arg, and the NOS-blocking agent L-NAME. DAF-FM fluorescence was recorded after 3 h of incubation. *** $P < 10^{-4}$.

a positive regulatory loop triggering *NIR* transcription downstream of NR-dependent transient NO^{\bullet} emission (Fig. 4B).

NOA Is Not Involved in the Onset of the Response of *Phaeodactylum* to Nitrogen Starvation

Since *Phaeodactylum* increases *NR* expression levels when nitrogen is limited (Levitan et al., 2015a; Yang et al., 2016), and since *NR* expression was slightly increased in the NOAOE background, we sought to determine whether NOA was also responsive to nitrogen availability. In a 3-d time course of cells shifted to nitrogen-depleted conditions, the typical nitrogen starvation responses occurred, that is, reduction of F_v/F_m chlorophyll fluorescence, and cell growth and induction of neutral lipids as measured by Nile Red staining (Fig. 5A). We confirmed a rapid, strong, and parallel induction of *NR* and *NIR* in response to nitrogen starvation (Fig. 5B). *SIR* and *NOA* responded to general nutrient deprivation with a late induction pattern, reaching a maximal 4- to 6-fold induction after 3 d of cultivation (Fig. 5B). Thus, although in nutrient-replete culture we had observed the over-expression of *NOA* correlated with higher *NR* and *NIR* levels, under nitrogen starvation the regulation of these genes is uncoupled. This is in contrast with *Chlamydomonas*, in which NO^{\bullet} was shown to be produced from cytosolic nitrite and act in the orchestrated response upon nitrogen shortage (Miller et al., 2010;

Wei et al., 2014). In *Phaeodactylum*, NO^{\bullet} does not appear as a mediator in the onset of the nitrate deprivation response.

Altogether, these results support a role of NOA and NO^{\bullet} in a fine tuning of the regulation of the nitrogen assimilation system more selective for nitrite over nitrate (uncoupled and higher up-regulation of *NIR* over *NR*), but this NO^{\bullet} -mediated pathway does not operate during nitrogen starvation, where a strong and parallel up-regulation of *NR* and *NIR* is triggered. We sought therefore to characterize the extent of the specific transcriptional changes induced by NO^{\bullet} at the whole genome scale.

Whole Genome Transcriptome Analysis in Response to Increasing Doses of NO^{\bullet} Highlights a Role in Nitrite Sensing, High-Nitrite Adaptation, and Reprogramming of Lipid Synthesis

We analyzed the effects of increasing doses of NO^{\bullet} on the whole transcriptome of *Phaeodactylum*. To that purpose, we supplied NO^{\bullet} from a saturated solution at concentrations of 3 and $10 \mu\text{M}$. Of the 12,393 referenced genes, reads were obtained for 11,464. We found 804 genes differentially expressed with a $|\text{Log}_2(\text{fold change})| > 1$ in at least one of the contrasts (i.e. comparing NO^{\bullet} supplies at $0 \mu\text{M}$ vs. $3 \mu\text{M}$, $0 \mu\text{M}$ vs. $10 \mu\text{M}$ or $3 \mu\text{M}$ vs. $10 \mu\text{M}$), and with P value < 0.05 . A partition of differentially expressed genes was performed using a *K-mean* method, with the number of partitions set to 6 (Liu et al., 2014). Each group

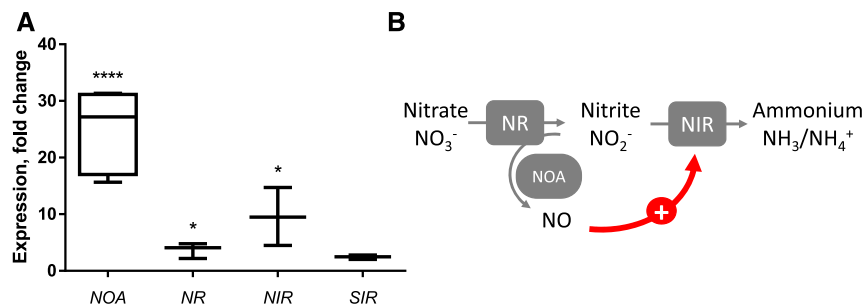


Figure 4. Effect of NOA overexpression on the expression level of nitrogen assimilation genes in nutrient-replete condition. A, NOA overexpression activates the transcription of the plastid ferredoxin-nitrite reductase. RNA was extracted from a 10^8 -cell pellet of NOAOE4, wild type, and pH4 and reversely transcribed. Quantitative real time PCR was conducted on 20 ng cDNA using oligonucleotides binding *TUB* as internal control and *NOA*, *NR*, *NIR*, and *SIR* as genes of interest. Quantification cycles of NOAOE4-derived cDNA were normalized to wild-type and pH4 values. Significant changes were observed on the level of *NOA* ($P < 10^{-4}$), *NR* ($P = 1.25 \cdot 10^{-2}$), and *NIR* ($P = 2 \cdot 10^{-2}$). B, Nitrite-sensing module. SIR, sulfite reductase.

or cluster consisted of genes with similar expression profiles following treatments with NO^{\cdot} (Supplemental Fig. S5; Supplemental Table S3). Two clusters were comprised of genes down-regulated following NO^{\cdot} treatments, that is, group 1 (DR_1 ; 55 genes) containing genes with the strongest magnitude in decreased expression (in the -2 to -4 Log2FC range) and group 2 (DR_2 ; 282 genes) with moderate but significant decreased expression (Log2FC approximately -1). Likewise, two clusters were comprised of genes up-regulated following NO^{\cdot} treatments, that is, group 6 (UR_1 ; 54 genes) containing genes with the strongest magnitude in expression increase (in the +2 to +4 Log2FC range) and group 3 (UR_2 ; 291 genes) with moderate but significant increased expression (Log2FC approximately +1; Supplemental Fig. S5; Supplemental Table S3). For each group, we sought whether gene ontology (GO) terms could be enriched, either by the DAVID method (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>; Huang et al., 2007; Supplemental Table S4) or using the Goseq R package (Young et al., 2010; Supplemental Table S5). We then mined information in the groups corresponding to a differential expression that could be correlated with the dose, that is, DR_1 , DR_2 , UR_1 , and UR_2 .

Focusing on genes up-regulated by NO^{\cdot} , we examined the possible metabolic pathways or cellular processes responsible for this reprogramming. Clearly, GO terms and metabolic pathways corresponding to nitrogen assimilation, glycolysis, phosphoenolpyruvate (PEP) production, pyruvate (Pyr) production, acetyl-CoA production, and glycerolipid production are enriched in UR_1 and UR_2 (in bold characters and underlined in Supplemental Tables S4 and S5). More specific GO terms retrieved concerning nitrogen metabolism include the carbamoyl synthase activity, arginosuccinate synthetase activity, Gln synthesis, and Arg synthesis. These terms highlight a possible activation of two pathways generating amino acids, that is, the Gln synthase/Gln oxoglutarate aminotransferase (GS/GOGAT) route producing Gln and Glu and the Orn-urea pathway. More specific GO terms retrieved concerning carbon metabolism include glycolysis,

phosphopyruvate hydratase activity, phosphoglycerate kinase activity, and lipid metabolism.

We thus examined the corresponding metabolic pathways in detail. Figure 6 shows the dose-dependent response of genes involved in nitrogen (nitrate, nitrite, ammonium) assimilation, incorporation into amino acids, and entry into the Orn-urea pathway, which was shown to be a specific metabolic feature of diatoms (Allen et al., 2011). The most evident response to low-dose treatments with NO^{\cdot} among the set of genes known to be involved in nitrogen assimilation is the specific expression of the gene coding for the plastid NIR protein, reducing NO_2^- into $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (Fig. 6A). We included in this analysis the gene putatively coding for the large subunit of a prokaryotic-type NADPH-dependent nitrite reductase (*NASB*; Allen et al., 2011; Levitan et al., 2015b), which is not transcriptionally modified in the high-nitrite adaptive response shown here (Fig. 6A). Genes coding for enzymes involved in nitrogen incorporation into amino acids via the GS/GOGAT route (Guerra et al., 2013) are up-regulated starting with the incorporation of NH_3 into Gln by GLNA, followed by the production of Glu by the Glu synthase systems, Mito-GLTX, Plastid-GLT, and GLTD. This up-regulated pathway is partly localized in the plastid, where NIR also resides (Fig. 6).

Genes encoding the Orn-urea pathway are clearly and coordinately activated, to the notable exception of one of its components, the arginase gene, *ARG* (Fig. 6A). Firstly, the mitochondrial carbamoyl phosphate synthase, CPS III, combining CO_2 and NH_4^+ into carbamoyl phosphate, is up-regulated. Following this capture of ammonium, carbamoyl phosphate is combined with Orn by the OTC, forming citrulline, then combined with Asp by the argininosuccinate synthase, ASUS. Argininosuccinate is broken down into Arg and fumarate by the argininosuccinate lyase, ASL. Whereas *CPS III*, *OTC*, *ASUS*, and *ASL* are all activated, *ARG* encoding the enzyme regenerating Orn and producing urea is unchanged, even slightly down-regulated. The expression

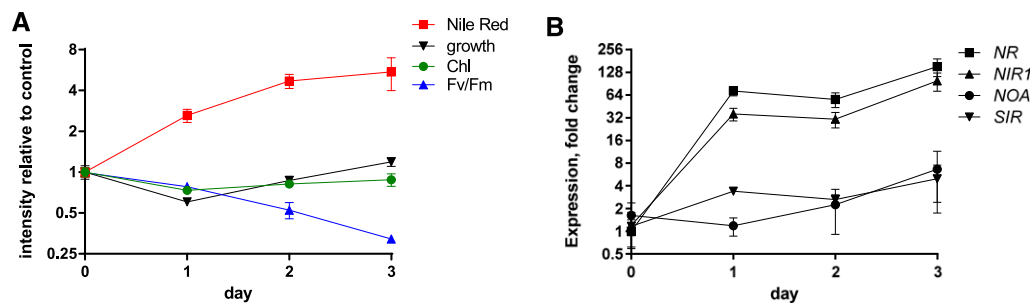


Figure 5. Expression of *NOA*, *NR*, *NIR*, and *SIR* in nitrogen-depleted wild-type *Phaeodactylum* cells. Cells were harvested and resuspended in nitrogen-free media in 100-mL cultures a concentration of 10^6 cells \cdot mL $^{-1}$. Each day, a 20-mL culture aliquot was harvested for RNA extraction and a 300- μ L culture aliquot was used for physiological measurements. A, Physiological parameters. Chl was measured by the absorption at 680 nm at room temperature, Nile red fluorescence was quantified to indicate neutral lipid contents, F_v/F_m was measured using fast chlorophyll fluorescence kinetics, and cell concentrations were estimated via the absorption at 730 nm. B, *NOA*, *NR*, *NIR*, and *SIR* gene expression. RNA was extracted from a cell pellet and reversely transcribed. Quantitative real-time PCR was conducted on 20 ng cDNA using oligonucleotides binding *TUB* as internal control and *NOA*, *NR*, and *NIR* as genes of interest. The *SIR* gene was used as a nitrogen-unrelated control. Data are normalized with value measured with cells harvested before the shift. Data are the results of three independent biological replicates.

level of *ARG* in control conditions, evaluated by DESeq2-normalized counts (in a total of 11,465 genes; Supplemental Table S3), is not low (approximately 1,800). Nevertheless, it is lower than that of *CPS III* (approximately 6,443) that reaches very high expression levels following NO $^{\circ}$ treatments (>18,000; Supplemental Table S3). A similar specific decrease of *ARG* expression compared to the other genes of the Orn-urea cycle has been reported previously in *Phaeodactylum* cells, following a shortage in phosphate (Yang et al., 2014). The so-called Orn-urea cycle is therefore likely not cyclic, interrupted, or highly slowed down at the level of Arg (Fig. 6B) and it appears therefore as a system mainly tuned to capture NH $_4^+$, without driving the production of urea. Consistently, the gene encoding the urease, *URE*, is also activated in parallel with the others, breaking down urea back into NH $_4^+$ and CO $_2$. Again, a similar activation of *URE* has been previously observed upon phosphate shortage (Yang et al., 2014). Orn, which needs to be recycled to allow this pathway to operate, can alternatively derive from Glu and acetyl-CoA, produced by an acetyl-Orn deacetylase. Two proteins containing zinc-peptidase-like domains in *Phaeodactylum* (Phatr3_J15083 and Phatr3_J18404) might possibly produce Orn by this pathway, but this function needs to be demonstrated. Taken together, all genes of the Orn-urea pathway seem to be mobilized to trap ammonium produced by *NIR* and use it to produce Arg.

Interestingly, exogenous NO $^{\circ}$ does not trigger the up-regulation of *NOA* (Fig. 6A). We sought sequences in the genome of *Phaeodactylum*, which might be homologous to genes involved in NO $^{\circ}$ signaling in other eukaryotes. As mentioned above, no *NOS* gene could be identified (Di Dato et al., 2015). Genes coding for a putative NOS-interacting protein and an NADPH-cytochrome P450 NOS homolog have been found, but their annotation is based on partial sequence similarities

and they do not respond to the NO $^{\circ}$ treatment (Fig. 6A). Thus, our analysis could not lead us to identify any component acting in the synthesis of NO $^{\circ}$ besides *NOA*.

Recently, NO $^{\circ}$ has been shown to nitrosylate an RNA-binding protein in the cytosol of *Chlamydomonas*, *NAB1*, which represses the translation of some mRNAs of photosynthetic components such as LHC II isoforms (Berger et al., 2016). A *NAB1*-like sequence was identified, lacking the nitrosylated domain identified in the *Chlamydomonas* sequence; nevertheless, the *NAB1*-like gene appeared as up-regulated by the treatment.

In this reprogramming, the NO $_2^- \rightarrow$ NH $_3$ /NH $_4^+ \rightarrow$ amino acid route is uncoupled from nitrate assimilation and activates both the GS/GOGAT and the Orn-urea pathway as the two gates to incorporate NH $_3$ /NH $_4^+$ (Fig. 6B). The GS/GOGAT route alone was reported previously to be a key regulatory site for the nitrate-dependent control of carbon partitioning between protein and lipid biosynthesis (Guerra et al., 2013). Lipid should therefore not accumulate. By contrast, because the *ARG* gene is uncoupled from the general up-regulation of the Orn-urea pathway, fumarate is expected to accumulate and feed carbon metabolism via malate. Based on the GO enrichment analysis, the PEP/Pyr hub and acyl-lipid metabolism were highlighted in differentially expressed genes. We thus examined the acyl-lipid anabolism and catabolism in more details, using a table of genes annotated for this purpose (Supplemental Table S6).

The most striking feature in carbon metabolism reprogramming is the coordinated up-regulation of the pathway synthesizing PEP, Pyr, and acetyl-CoA in the plastid (Supplemental Table S6). These include the gene coding for the plastid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Plastid-GAP* (Phatr3_J22122), the phosphoglycerate kinase, *Plastid-PGK* (Phatr3_J29157), and the enolase, *Plastid-ENOL* (Phatr3_J41515), leading to the

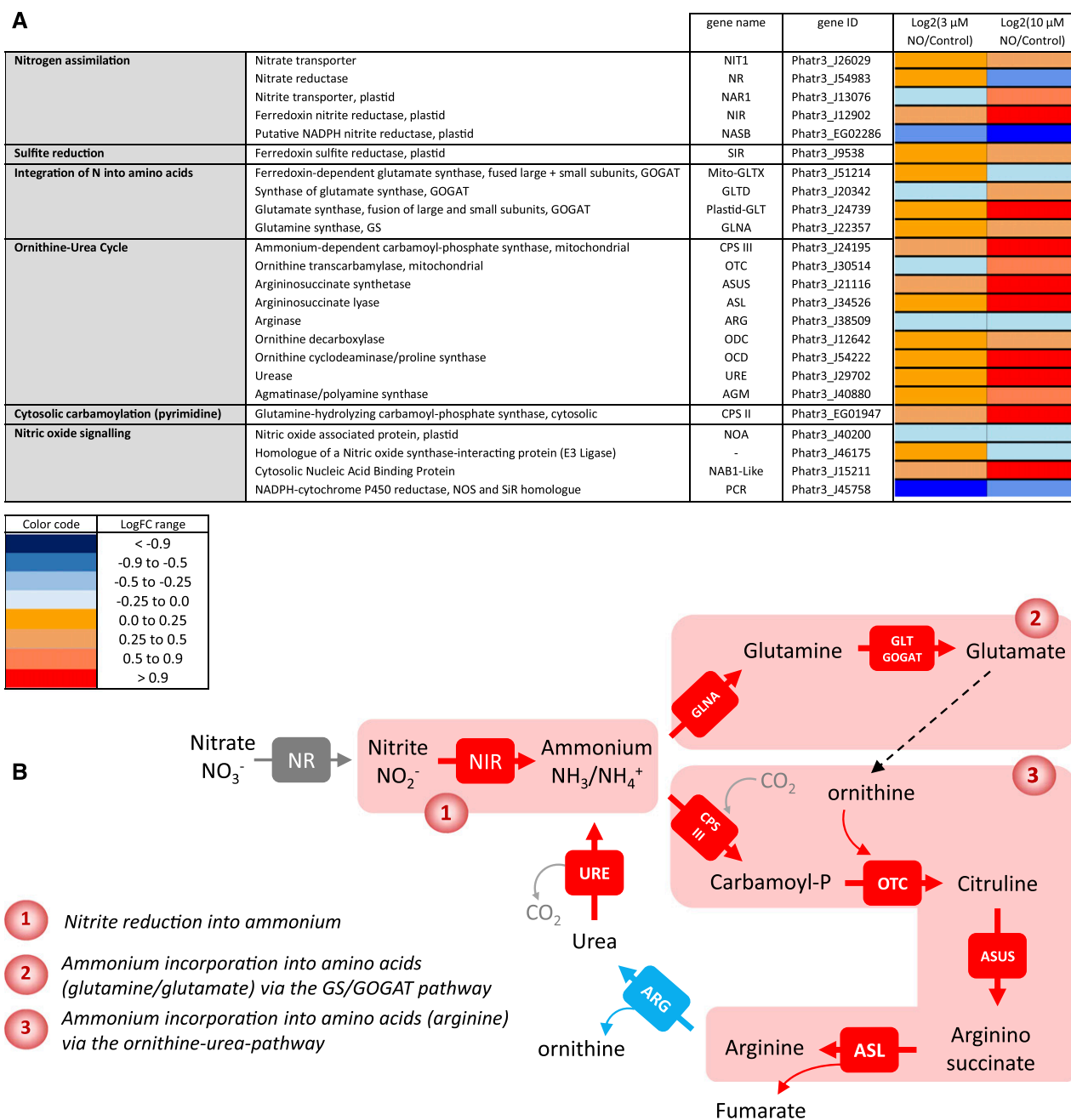


Figure 6. Dose-response expression of nitrogen assimilation genes following treatment with increasing concentrations of NO[•]. A, Gene differential expression after treatments with NO[•]. *Phaeodactylum* cells were treated with 0 (control), 3, and 10 μ M NO[•] using a calibrated NO[•]-saturated aqueous solution and after 96 h of NO[•] treatment, RNA was extracted and subjected to a RNAseq analysis. Libraries for each sample were prepared for stranded 100-bp paired end sequencing and samples were combined and analyzed in a single Illumina HisEquation 2000 lane. Reads were mapped on the most recent genome version of *Phaeodactylum tricornutum* (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum). Annotated genes coding for nitrogen assimilation were then used to probe changes in three metabolic modules, that is, nitrogen assimilation, integration of nitrogen into amino acids, and integration of nitrogen via the Orn-urea pathway (or cycle). NOA expression was also examined. Eventually, genes with some sequence similarity with genes acting in NO[•] signaling in other organisms were also included, although this function seems unlikely based on our study. B, Pathways of nitrogen assimilation and incorporation into amino acids up-regulated by NO[•].

synthesis of PEP. The Pyr kinase, *Plastid-PKP* (Phatr3_J22404), leading to the production of Pyr, and two genes coding for dihydrolipoamide acetyltransferase E2 components of the Pyr dehydrogenase complex, *Plastid-DHLATa* and

Plastid-DHLATb (Phatr3_J23850 and Phatr3_EG02309), are up-regulated, acting in the direction of a production of acetyl-CoA (Supplemental Table S6). Based on this transcriptome reprogramming, carbon metabolism,

including the excess of fumarate generated by the activated Orn-urea cycle, can converge toward a production of acetyl-CoA.

Downstream of acetyl-CoA, the activation of fatty acid and TAG biosynthesis is not obvious based on the transcriptomic response to NO[•] (Supplemental Table S6). The production of a diacyl moiety in the plastid appears slightly stimulated via a coordinated up-regulation of a glycerol-3-phosphate acyltransferase, *ATS1* (Phatr3_J3262), and two 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferases, *ATS2a* and *ATS2b* (Phatr3_J11916 and Phatr3_J43099). The production of TAG could be sustained by a moderate up-regulation of an ER localized acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase, *DGAT2B* (Phatr3_J49544). Genes coding for enzymes involved in TAG and fatty acid degradation do not respond significantly to the NO[•] treatment (Supplemental Table S6).

The gene coding for the lipid droplet protein, *LDP* (Phatr3_J48859; Yoneda et al., 2016) is up-regulated as an unambiguous marker of TAG accumulation. In addition, two lipases that could possibly degrade TAG are down-regulated, that is, a TAG lipase gene, *TAGL-Like-B* (Phatr3_J48799) and a phospholipase A, *PLA-A* (Phatr3_J44005; Supplemental Table S6). An accumulation of TAG can therefore occur via a push/protect activated process, pushing at the level of acetyl-CoA production and to some extent fatty acid synthesis and protecting by producing LDP and preventing TAG hydrolysis.

An intriguing coordinated response was the clear up-regulation of fatty acid (FA) desaturase genes (Dolch and Marechal, 2015): the plastid ω 6-acyl-lipid desaturase, *FAD6* (Phatr3_J48423); the plastid Δ 6-FA desaturase, *Plastid-Delta6FAD* (Phatr3_EG02619); the ER localized ω 6-acyl-lipid desaturase, *FAD2* (Phatr3_J25769); an ER localized Δ 5-FA front-end desaturase, *ER-delta5-FAD-A* (Phatr3_J46830); and Δ 6-FA front-end desaturase, *ER-delta6-FAD* (Phatr3_J29488; Supplemental Table S6). Following NO[•] treatment, it is likely that polyunsaturated FAs (PUFAs) become nitrated via NO[•]-derived radicals, forming NO₂-FAs (Baker et al., 2009; Sánchez-Calvo et al., 2013; Fazzari et al., 2014). One should therefore expect that the treatment leads to a degradation of PUFAs, which might be compensated by the up-regulation of FA desaturase genes.

Taken together, the remodeling of lipid upon exposure to NO[•] seems not solely based on gene expression reprogramming, since only TAG accumulation could possibly be activated transcriptionally, whereas a compensating mechanism for a loss of very-long chain PUFAs (VLC-PUFAs) seems to be activated. We sought therefore to refine our analysis of lipid changes and advance in the possible mechanism of action of NO[•] in this remodeling.

NOA Induces a Specific Glycerolipid Remodeling in *Phaeodactylum*, Marked by a Change in the MGDG/TAG Balance

Comprehensive lipid analyses need cell amounts that could not be obtained with the treatment of wild-type cells with NO[•]. Using NOAOE lines as a model of

a nontransient exposure to NO[•], we could observe that in nutrient-replete conditions, the level of TAG per cell estimated by Nile Red staining was higher, consistent with a larger number of intracellular lipid droplets, as observed for SNAP-treated cells (Supplemental Fig. S6). We extracted lipids and performed fatty acid analyses and whole glycerolipidomic profiling. Consistent with the Nile Red measurements, the total fatty acid profile of NOAOE lines compared to the wild type indicated significantly higher 16:0 and 18:0 levels and an approximately 1.5-fold increase in TAG productivity (Fig. 7, A and C). By contrast, VLC-PUFAs displayed trends of reductions and accordingly the greatest sink for VLC-PUFAs, that is, chloroplast monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), was significantly reduced in the overexpression lines (Fig. 7B). The distribution of fatty acids in the different lipid classes was reported previously (Abida et al., 2015) and was similar in this study. The fatty acid profiles in TAG and MGDG lipid classes were unaltered (Supplemental Fig. S7).

According to the lipid profiles, the most affected lipids in NOAOE lines were MGDG and TAG. The increase in TAG is consistent with the transcriptomic analyses reported above, as evidenced by the coordinated up-regulation of genes involved in acetyl-CoA production, TAG biosynthesis, and the gene coding for the lipid droplet protein, LDP. Among the putative genes possibly involved in MGDG biosynthesis, *MGD1*, *MGD2*, and *MGD3* (Phatr3_J54168, Phatr3_J9619, Phatr3_J14125), no read could be counted for *MGD3* and the expression of *MGD1* and *MGD2* was not significantly altered upon NO[•] treatment (Supplemental Table S6). We sought to determine whether the decrease in galactolipids could occur by a direct effect of NO[•] on MGD activity.

Direct Inhibitory Effect of NO[•] on the Enzymatic Activity of *Phaeodactylum* MGDG Synthase

We used the enzymatic assay developed for plant MGDG synthase, providing radioactive uridine diphosphogalactose (UDP-Gal) to *Phaeodactylum* protein extracts, and measured the incorporation of the radioactivity in galactolipids extracted by solvents, following incubation with increasing concentrations of SNAP (Fig. 8A). MGDG synthase activity was altered, with a 50% decrease following incubation with 0.5 mM SNAP. This result showed that NO[•] can affect MGDG synthases, likely by S-nitrosylation of the thiol groups known to be essential for the activity of this enzyme (Maréchal et al., 1994b, 1995). This enzymatic inhibition could be responsible for a decrease of plastid glycerolipid biosynthesis and thus contribute to the partial redirection of glycerolipid flux toward TAG (Fig. 8B).

CONCLUSION

In summary, this study was motivated by evaluating the possible impact of environmental variations of the NO[•] level in oceans on phytoplankton, and more

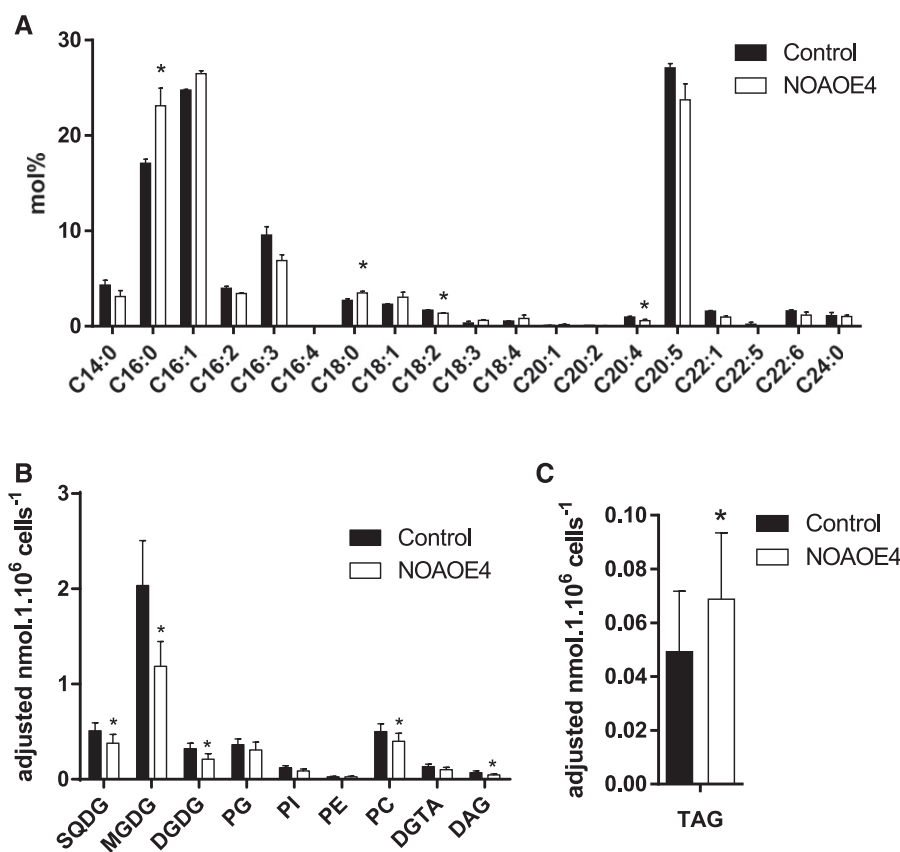


Figure 7. Effect of NOA overexpression on total fatty acid and glycerolipid profiles in *Phaeodactylum* cells grown in nutrient-replete conditions. Three-day-old 50-mL cultures inoculated at 10^6 cells \cdot mL $^{-1}$ were harvested and lipids extracted. A, Total FA distributions. The FA distribution in total lipid extracts was based on gas chromatography coupled with flame ionization detection analyses of FAME. B, Membrane glycerolipid profiles. C, TAG content. Glycerolipid class abundances per million cells were assessed based on high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses. Data are the result of triplicate analyses. DGDG, digalactosyldiacylglycerol; DGTA, diacylglycerol hydroxymethyltrimethyl- β -Ala, PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol. Stars indicate significant changes with $P < 0.05$.

particularly diatoms. NO $^{\bullet}$ was previously reported to be emitted by diatoms in response to high concentrations of PUAs such as DD and then to act in cell-to-cell communication, triggering PCD and allowing diatom population size control (Vardi et al., 2006, 2008; Bidle, 2015). We could not confirm this physiological response, in line with previous reports suggesting that DD triggered membrane leakage and nonspecific toxicity in

Phaeodactylum (Ribalet et al., 2007). We do not exclude that a physiological response to DD might occur in the pico- to nanomolar range, which should be evaluated in the future, in the absence of methanol. Likewise, we could not confirm the previously reported production of NO $^{\bullet}$ by a NOS-like activity in *Phaeodactylum* using Arg as a substrate (Vardi et al., 2006, 2008). Rather, our work shows that in *Phaeodactylum*, NO $^{\bullet}$ is produced via a

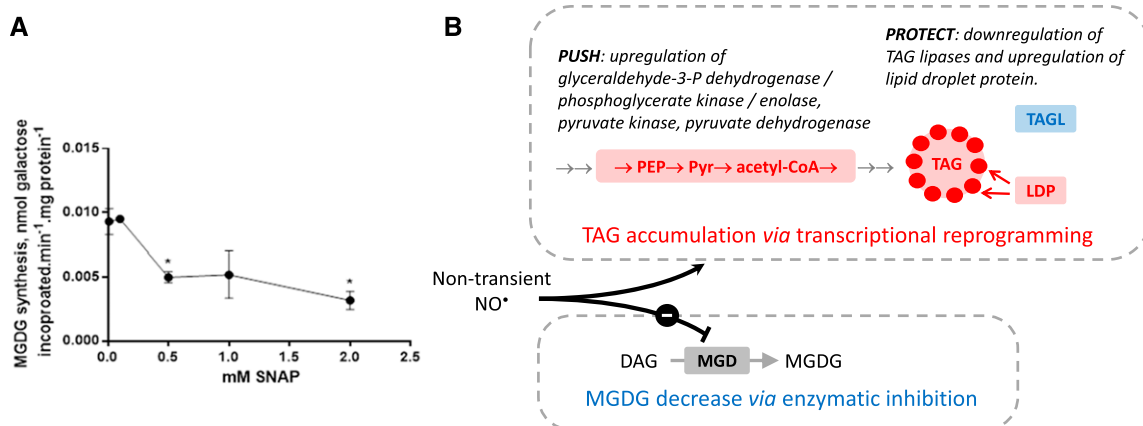


Figure 8. A, Effect of NO $^{\bullet}$ on the MGDG synthase activity in *Phaeodactylum* membrane extracts. Activity was assayed based on the incorporation of Gal in MGDG, following incubation with radiolabeled UDP-[14 C]Gal. Data are the results of three technical replicates. Stars indicate significant changes with $P < 0.05$. B, Lipid remodeling via transcriptional reprogramming and enzymatic regulation.

nitrite-dependent pathway, by a side activity of the NR, acting therefore in a nitrite-sensing system. The nitrite-sensing role of NO[•] is likely transient, since the assimilation of nitrite and its reduced form, ammonium, is coordinately up-regulated by NO[•] at the transcriptional level, therefore consuming nitrite and activating both amino acid biosynthesis and the Orn-urea pathway. One should keep in mind that not all diatoms lack a *NOS* gene (Di Dato et al., 2015) and that the nitrite-sensing system might be different in *NOS*-containing diatoms. The NO[•]-dependent remodeling of carbon metabolism seems to depend, at least partly, on the presence of the Orn-urea pathway, producing fumarate as a side-product. Our analyses are consistent with a role of NO[•] on the remodeling of glycerolipids redirecting carbon flux toward the production of TAG, at least partly via transcriptomic reprogramming, and the specific decrease of MGDG, by enzymatic inhibition of MGD activity. This specific feature of diatoms is consistent with previous studies showing that lipid production in *P. tricornutum* could be optimized when nitrate assimilation was inhibited and ammonium was the sole nitrogen source (Frada et al., 2013). We propose a revision of the physiological and ecophysiological role of NO[•] in diatoms, which appears related to the environmental nitrogen status and more specifically the level of nitrite. An anthropogenic increase of NO[•] in the environment could therefore alter nitrogen assimilation systems and act as an important stressor at the ecosystem level. Future works include the characterization of the interplay between nitrate, nitrite, and NO in diatoms involving NR, NIR, amino acid biosynthesis, Orn-urea pathway, and NOA; the functional characterization of these genes; and eventually a reevaluation of possible roles of NO[•] in the response to abiotic or biotic stresses.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The chemicals used in the composition of growth media, the solvents as well as CHAPS, 1,2-dioleoyl-sn-glycerol (DAG), MOPS, NAP, SNAP, phosphatidylglycerol (PG), and unlabeled UDP-Gal were obtained from Sigma-Aldrich. The DAF-FM was purchased from Thermofisher Scientific. The diatom-derived aldehyde DD was obtained from Acros organics. [¹⁴C]labeled (11.0 GBq.mmol⁻¹) UDP-Gal was obtained from New England Nuclear. The caspase/metacaspase inhibitor Z-VAD-FMK was purchased from Promega.

Cultivation of *Phaeodactylum tricornutum*

P. tricornutum (Pt1) Bohlin Strain 8.6 CCMP2561 (Culture Collection of Marine Phytoplankton, now known as NCMA: National Center for Marine Algae and Microbiota) was used in all experiments. Pt1 cells were maintained and grown in 20 mL or 50 mL at 20°C, in 250-mL flasks, in a modified ESAW medium (NaCl 362.7 mM; Na₂SO₄ 25 mM; KCl 8.03 mM; NaHCO₃ 2.067 mM; KBr 0.725 mM; H₃BO₃ 0.372 mM; NaF 0.0657 mM; MgCl₂ 47.18 mM; CaCl₂ 9.134 mM; SrCl₂ 0.082 mM; Na₂-glycerophosphate 21.8 μM; Na₂SiO₃ 105.6 μM; Na₂EDTA 14.86 μM; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 5.97 μM; FeCl₃ 0.592 μM; MnSO₄ 2.42 μM; ZnSO₄ 0.254 μM; CoSO₄ 0.0569 μM; Na₂MoO₄ 0.52 μM; H₃BO₃ 61.46 μM; Na₂SeO₃ 10 mM; biotin [vitamin H] 8.18 nM; cobalamin [vitamin B12] 2.94 nM; thiamine [vitamin B1] 0.594 μM; Falciatore et al., 2000), using either 10 times enriched nitrogen and phosphate sources (10× ESAW, containing 5.49 mM NaNO₃ and 0.22 mM NaH₃PO₄; Abida et al., 2015) or the same medium without nitrogen. Cells were

grown on a 12:12 light (30 μE m⁻² · sec⁻¹) / dark cycle. Cells were subcultured twice a week by inoculating 1 · 10⁶ cells · mL⁻¹ with fresh media. Growth was evaluated by cell counting using a Malassez counting chamber or by the absorption at 730 nm using a TECAN plate reader.

Incubation of *Phaeodactylum* with NO[•]-Saturated Solutions or NO[•] Donors

Incubation of *P. tricornutum* with gaseous NO[•] was performed by using NO[•]-saturated aqueous solutions. In this approach, a tank of pure NO[•] was bubbled into a small quantity of distilled water until the saturation point was reached, confirmed by mass spectrometric analysis of the solution. The concentration of NO[•] in a saturated solution was taken to be 1.9 mM (Gerrard, 1980). NO[•] saturations were then typically diluted 20- to 200-fold for use with live *Phaeodactylum* suspensions. Alternatively, an NO[•]-donor agent, SNAP, was used. This compound releases NO[•] when dissolved (Miller and Megson, 2007) and was therefore prepared freshly immediately before use. NAP was used as a non-active compound for control experiments.

Incubation of *Phaeodactylum* with DD

Since DD is a highly toxic and volatile compound, all experiments were performed under a fume hood safety cabinet, and only freshly prepared DD solutions were used, either solubilized in pure methanol or in the growth medium. A 1-mL volume of a *Phaeodactylum* culture was inoculated at a cell density of 1.2 · 10⁶ cell · mL⁻¹ in 24-well plates, with different concentrations of DD in the absence or presence of methanol (final concentration 0.5%) during 3 h. For experiments with the caspase/metacaspase inhibitor, Z-VAD-FMK was used at a final concentration of 20 μM. Growth was quantified based on the absorption at 730 nm using a TECAN infinite M1000Pro plate reader.

Measure of NO Using DAF-FM, a Fluorescent Reporter Molecule

The DAF-FM allows the sensitive detection of low levels of nitric peroxide (ONOO⁻), which is in equilibrium with NO[•] and thus indicates NO[•] levels (St Laurent et al., 2015). DAF-FM was previously used to detect NO[•] levels in *P. tricornutum* cells (Vardi et al., 2008). Cultures were diluted to obtain 10⁶ cells mL⁻¹ in 10 mL, and cells were incubated under gentle shaking with 20 μL of 5 mM DAF-FM (in DMSO) for 1.5 h at room temperature and in the dark. Cells were washed and resuspended in 10 mL of fresh 10× ESAW medium. Aliquot fractions (500 μL) were transferred to a 48-well culture plate, to which SNAP was added as indicated. For the examination of DAF-FM-dependent detection of nitric peroxide, 150-μL samples were transferred into a 96-well plate and fluorescence was measured with a TECAN infinite M1000Pro plate reader (excitation wavelength at 488 nm, emission at 529 nm).

Chlorophyll Fluorescence Measurements

To determine photosynthesis parameters in cell cultures, room temperature fast chlorophyll fluorescence kinetics were measured using a Speedzeen MX fluorescence imaging system (JBeamBio) with settings previously described (Johnson et al., 2009; Allouret et al., 2013). To this end, a 150-μL volume of *P. tricornutum* culture was transferred to a transparent 96 well-plate and dark-incubated for 15 to 30 min before measurements. Excitation was performed in the blue range (λ = 450 nm, *F₀*). *F₀* is the steady-state fluorescence in dark-adapted cultures, *F_m* is the maximal fluorescence after a saturating light pulse with green light (520 nm) of dark-adapted cultures, *F_m'* the same in light adapted cultures, and *F_v* is the difference between *F_m* and *F₀*. With these parameters, the maximum efficiency of energy conversion of PSII can be calculated as *F_v'*/*F_m'* and photochemical quenching capacity indicated by the quantum yield of PSII as *Y(II)* = (*F_m'* - *F_v'*)/*F_m'* (Butler and Kitajima, 1975; Misra et al., 2012).

Extraction and Determination of Chlorophyll a Level

A 700-μL culture of *Phaeodactylum* incubated in presence of various concentrations of DD was centrifuged for 3 min at 13,000g. The supernatant was removed and the pellet was suspended in 1 mL pure methanol. Samples were then centrifuged for 3 min at 13,000g, and the supernatant was used to measure

A_{652} (A_{652}), 665 nm (A_{665}), and 750 nm (A_{750}) using a Jasco V-650 spectrophotometer. Chlorophyll a level (Chl a) was determined following the equation $\text{Chl a} = 16.29 (A_{665} - A_{750}) - 8.54 (A_{665} - A_{750})$ (Porra et al., 1989).

Measure of TAG Accumulation by Nile Red Staining

Accumulation of TAG droplets was monitored by Nile Red (Sigma-Aldrich) fluorescent staining (excitation wavelength at 485 nm; emission at 525 nm) as previously described (Cooksey et al., 1987; Abida et al., 2015). In brief, cells were diluted and adjusted to a cell density that was linearly correlated with Nile Red fluorescence. Nile Red solution (40 μL of a 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ stock solution in DMSO) was added to 160- μL cell suspensions. Oil bodies stained with Nile Red were then visualized using a Zeiss AxioScope.A1 microscope (FITC filter; excitation wavelength at 488 nm; emission at 519 nm). The productivity, corresponding to the accumulation of TAG per volume and per time unit, was calculated based on the staining by Nile Red and expressed in relative fluorescence unit of Nile Red per milliliter and per day of incubation. Alternatively, Nile red fluorescence values were normalized to the cell concentration.

Genetic Construction for NOA Overexpression

Genomic DNA was extracted from *P. tricornutum* Pt1 cells using the following procedure. Firstly, 10^8 cells were harvested and frozen in liquid nitrogen. A volume of 20 μL of Edward-buffer (Tris-HCl 200 mM, pH 7.5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0.5%, w/v) was added, then samples were homogenized and debris removed by centrifugation. The supernatant was transferred to the same volume of isopropanol to precipitate DNA. After an additional 15-min centrifugation at 10,000g, the pellet was washed with ethanol 70%, dried, and solubilized in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH7, 1 mM EDTA). DNA concentration was measured using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Using genomic DNA as matrix, a 2,352-bp sequence was amplified by PCR with the following oligonucleotides designed from Phatr2_56150 (Vardi et al., 2008) and carrying respectively *Xba*I and *Eco*RI restriction sites (underlined sequence): NOA-Fw *Xba*I 5'-TTTATCTAGAAATGG-TCCCACTGGTTGTATG-3', NOA-Rev *Eco*RI 5'-TTTAGAATTCCTAATTACGCCCTACACCTTTTCTTC-3'. The gene ID of NOA in the third version of the genome (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum) is Phatr3_J40200. PCR was performed using Phusion High Fidelity polymerase (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. The PCR product was digested by *Eco*RI and *Xba*I, purified, and cloned in the linearized expression vector. The expression vector used for overexpression corresponds to the pH4-GUS vector (De Riso et al., 2009). The vector contains a gene coding for resistance to Zeocin (Shble), allowing selection of transformed cells. Expression of the NOA gene is controlled by the constitutive histone 4 promoter.

Transformation of *Phaeodactylum* and Selection of Strain Overexpressing NOA

Wild-type *P. tricornutum* cells were transformed via particle-bombardment under aseptic conditions (Kikkert, 1993) using a protocol described previously (Falcatore et al., 1999) modified as follows. A 3- to 4-d-old Pt1 culture was concentrated to 4.10^7 cells in 500 μL and spread onto a 1% agar-plate containing $1 \times$ ESAW medium. While shaking vigorously, 2 to 3 μg of nonlinearized plasmid was added to 25 μL ethanol-sterilized tungsten particles (Sigma), together with 25 μL of 2.5 M CaCl_2 and 10 μL of 0.1 M spermidine. After mixing for 3 min using a vortex, the pellet was washed two times (1,500 g; 5 s; room temperature) with 700 μL precooled 100% ethanol. DNA-coated tungsten particles were then resuspended in 25 μL 100% ethanol. A 12- μL fraction of the mix was transferred onto a microcarrier, and bombardment was carried out using 1,550-psi rupture disks (BioRad). After 2 to 3 d of incubation under continuous illumination, cells were transferred to similar agar-plates containing 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Zeocin (Promega) for the selection of resistant transformed cells. Colonies appearing after 4 to 6 weeks were transferred to a new plate for 1 week, prior to inoculation of 20-mL liquid cultures.

Analysis of NOA Gene Expression in *P. tricornutum* Cells

To quantify the NOA mRNA level in overexpressing lines, quantitative PCR (qPCR) was performed after reverse transcription (RT) of extracted RNA (RT-qPCR). RNA was extracted from 10^7 cells that were previously pelleted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until processing. A volume of 1 mL

TriReagent (Sigma) was added to the frozen pellet and transferred to a new Eppendorf tube. After mixing for 30 s using a vortex, samples were incubated for 5 min at room temperature. Chloroform (200 μL) was added and tubes inverted and incubated for 15 min at room temperature. Phase separation was achieved by centrifugation (1,500g; 30 min; 4°C). The upper phase was transferred to a new tube, and RNA was precipitated using 1 volume isopropanol (1,500g; 30 min; 4°C), washed with 75% ice cold ethanol (1,500g; 5 min; 4°C), and the pellet was dried in a Speed Vac system (Eppendorf Concentrator 5301) prior to suspension in 30 μL diethyl dicarbonate-treated water (Sigma) at 65°C for 10 min. RNA was purified following a second ethanol precipitation using 1 volume of 5 M ammonium acetate (2.5 M final concentration), and 1 volume isopropanol. Samples were incubated for 10 min on ice and centrifuged, washed, dried, and resuspended as above. Concentration was determined using a NanoDrop device (Thermo Scientific). The RNA obtained (1 μg) was used for RT after DNase treatment (Qiagen) following manufacturer's instructions to yield 1 μg cDNA, which was diluted to 10 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$. For quantitative real time PCR, housekeeping gene oligonucleotides previously described (Siaut et al., 2007), namely *RPS* (5'-CGAAGTCAACCAGGAAACCAA-3' and 5'-GTGCAAGA-GACCGGACATACC-3') and *TUBA* (5'-CTGGAGCCTTACTGCTTGGGA-3' and 5'-ATGGCTCGAGATCGACGTA-3'), were used as internal controls. NOA-specific oligonucleotides were 5'-CCTGAAAAGTTCGCTACGCA-3' and 5'-CGGATCCTTTTGCCTGAG-3'. The total qPCR reaction volume was 10 μL (120 nm oligonucleotide, 20 ng cDNA, 5 μL 2X SYBR Green Sso Advanced [Bio-Rad]). A two-step thermo-profile in 40 cycles was applied after 3 min at 95°C initial denaturation (95°C for 10 s; 58°C for 30 s) and a melt curve was detected (from 65°C to 95°C with a 0.5°C increment) (Bio-Rad CFX Connect Real-Time System). Evaluation of gene expression was carried out in three biological replicates, each one with technical triplicates, using the CFX Connect Real-Time System software, with *TUBA* and *RPS* as internal controls.

Lipidomic Profiling by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

Glycerolipids were extracted from freeze-dried *P. tricornutum* cells grown in 50 mL of medium. About $50 \cdot 10^6$ to $100 \cdot 10^6$ cells are required for a triplicate analysis. First, cells were harvested by centrifugation and immediately frozen in liquid nitrogen. Once freeze-dried, the pellet was suspended in 4 mL of boiling ethanol for 5 min to prevent lipid degradation, and lipids were extracted as described previously (Simionato et al., 2013) by addition of 2 mL methanol and 8 mL chloroform at room temperature. The mixture was then saturated with argon and stirred for 1 h at room temperature. After filtration through glass wool, cell debris was rinsed with 3 mL chloroform/methanol 2:1 (v/v), and 5 mL of 1% NaCl was then added to the filtrate to initiate phase separation. The chloroform phase was dried under argon before solubilizing the lipid extract in 1 mL of chloroform. Total glycerolipids were quantified from their FAs: in a 10- μL aliquot fraction, a known quantity of saturated 15-carbon FA (15:0) was added and all FAs were methanolized into methyl esters (FAME) by a 1-h incubation in 3 mL 2.5% H_2SO_4 in pure methanol at 100°C (Jouhet et al., 2003). The reaction was stopped by addition of 3 mL water, and 3 mL hexane was added for phase separation. After 20 min of incubation, the hexane phase was transferred to a new tube. FAMES were extracted a second time via the addition, incubation, and extraction of another 3 mL hexane. The combined collected hexane fractions (6 mL) were argon-dried and FAMES were suspended in 30 μL hexane for analysis by gas chromatography coupled with flame ionization detection (Perkin Elmer) using a BPX70 (SGE) column. FAMES were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma) and quantified by the surface peak method using 15:0 for calibration. Extraction and quantification were performed with at least three biological replicates. Glycerolipids were then analyzed and quantified by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry with appropriate standard lipids. The lipid extracts corresponding to 25 nmol of total FAs were dissolved in 100 μL of chloroform/methanol 2/1 (v/v) containing 125 pmol of each internal standard. Internal standards used were PE 18:0-18:0 and DAG 18:0-22:6 from Avanti Polar Lipid and sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) 16:0-18:0 extracted from spinach (*Spinacia oleracea*) thylakoid (Dème et al., 2014) and hydrogenated (Buseman et al., 2006). Lipids were then separated by HPLC and quantified by MS/MS. The HPLC separation method was adapted from a previously described procedure (Rainteau et al., 2012). Lipid classes were separated using an Agilent 1200 HPLC system using a 150-mm \times 3-mm (length \times internal diameter) 5- μm diol column (Macherey-Nagel) at 40°C . The mobile phases consisted of hexane/isopropanol/water/1 M ammonium acetate, pH 5.3 [625/350/24/1 (v/v/v/v)] (A) and isopropanol/water/1 M ammonium acetate, pH 5.3 [850/149/1 (v/v/v)] (B). The injection volume was 20 μL . After 5 min, the percentage of B was increased linearly from 0% to 100% in

30 min and kept at 100% for 15 min. This elution sequence was followed by a return to 100% A in 5 min and an equilibration for 20 min with 100% A before the next injection, leading to a total runtime of 70 min. The flow rate of the mobile phase was 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. The distinct glycerophospholipid classes were eluted successively as a function of the polar head group. Mass spectrometric analysis was performed on a 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent) equipped with a Jet stream electrospray ion source under following settings: drying gas heater at 260°C, drying gas flow at 13 L \cdot min⁻¹, sheath gas heater at 300°C, sheath gas flow at 11 L \cdot min⁻¹, nebulizer pressure at 25 psi, capillary voltage at ± 5000 V, and nozzle voltage at ± 1000 V. Nitrogen was used as collision gas. The quadrupoles Q1 and Q3 were operated at widest and unit resolution respectively. Phosphatidylcholine and diacylglycerol hydroxymethyltrimethyl- β -Ala analyses were carried out in positive ion mode by scanning for precursors of m/z 184 and 236 respectively at a collision energy (CE) of 34 and 52 eV. SQDG analysis was carried out in negative ion mode by scanning for precursors of m/z -225 at a CE of -56 eV. PE, phosphatidylinositol (PI), phosphatidylglycerol, MGDG, and digalactosyldiacylglycerol measurements were performed in positive ion mode by scanning for neutral losses of 141 D, 277 D, 189 D, 179 D, and 341 D at CEs of 20 eV, 12 eV, 16 eV, 8 eV, and 8 eV, respectively. DAG and TAG species were identified and quantified by multiple reaction monitoring as singly charged ions $[M+\text{NH}_4]^+$ at a CE of 16 and 22 eV, respectively. Quantification was done for each lipid species by multiple reaction monitoring with 50 ms dwell time with the various transitions previously recorded (Abida et al., 2015). Mass spectra were processed using the MassHunter Workstation software (Agilent) for identification and quantification of lipids. Lipid amounts (pmol) were corrected for response differences between internal standards and endogenous lipids.

MGDG Synthase Enzymatic Assay

A culture of *P. tricornutum* (50 mL in 10 \times ESAW medium) was arrested in exponential phase and protein concentration determined using the Lowry method (Lowry et al., 1951). Cells were harvested by a centrifugation for 10 min at 1,500g at 4°C. The pellet was resuspended in 1 volume of 12 mM CHAPS and 20 mM MOPS-KOH, pH 7.8, and incubated for 20 min at 4°C to solubilize membrane proteins. Detergent solubilized proteins (10 μg) were then incubated for 1 h with variable concentrations of SNAP (from 0 to 2 mM, as indicated) at room temperature in the dark in a final volume of 66.5 μL . After incubation with SNAP, galactosyltransferase enzyme activity was assayed in mixed micelles at 25°C, as described previously (Maréchal et al., 1994a, 1994b). Phosphatidylglycerol (1.3 mM) and 1,2-dioleoyl-sn-glycerol (160 μM) dissolved in chloroform were first introduced into clean glass tubes. After evaporation of chloroform under a stream of argon, 300 μL of incubation medium adjusted to contain 10 μg proteins, 6 mM CHAPS, 250 mM KCl, 250 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, and 10 mM MOPS-KOH, pH 7.8, were added. The mixture was mixed vigorously and kept 1 h at 25°C for equilibration of mixed micelles. The reaction was then started by addition of 1 mM UDP-[¹⁴C]Gal (37 Bq \cdot μmol^{-1}) and stopped after 20 min by addition of chloroform/methanol (1:2, v/v). The lipids were subsequently extracted (Bligh and Dyer, 1959) and the radioactivity of the [¹⁴C]-labeled MGDG produced, determined by liquid scintillation counting. Activity is expressed in nmol incorporated Gal \cdot h⁻¹ \cdot mg protein⁻¹.

RNaseq Analysis

An actively growing stock culture of *P. tricornutum* was used to inoculate duplicate 100-mL experimental cultures in 250-mL Erlenmeyer flasks at an initial cell density of 2.10⁶ cells \cdot mL⁻¹. Using a calibrated saturated NO⁻ solution, single additions at the start of the experiment were made to treated cultures to produce initial concentrations of either 3 or 10 μM NO⁻. Untreated cultures received no NO⁻. Cultures were allowed to grow for 4 d before harvesting cells by centrifugation at 5,000 rpm for 15 min at room temperature. After discarding the supernatant, cell pellets were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before processing. In brief, cell aliquots were processed individually by grinding in liquid nitrogen in a mortar and pestle followed by extraction in RNA Pro lysis solution (MP Biomedicals) using a FastPrep homogenizer (two 40-s cycles, with power set at level 6, following manufacturer's instructions). After centrifugation, the supernatant was recovered and extracted with chloroform; RNA was precipitated by addition of an equal volume of cold absolute ethanol and incubation at -20°C overnight. Precipitated RNA was recovered by centrifugation, washed in 75% ethanol, and air dried. The pellet was dissolved in RNase-free water and further purified using the clean-up protocol for the Qiagen RNeasy Mini Kit. RNA samples were quantified with a NanoDrop spectrophotometer and analyzed on an Agilent BioAnalyzer using the Plant RNA Nano program. Then 2.5 μg of each RNA was sent for RNA-Seq analysis at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre. Libraries for each sample were prepared for stranded 100-bp paired end sequencing, and samples were combined

and analyzed in a single Illumina HiSeq2000 lane. Reads were mapped on the most recent genome version of *P. tricornutum* (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum) using the Star (Spliced Transcripts Alignment to a Reference) method (Dobin et al., 2013; Engström et al., 2013). Data were filtered based on the detection of one read in at least one sample per treatment or genomic mutation and then normalized using the DESeq2 method (Varet et al., 2016). Only genes being differentially expressed with a $|\text{Log}_2(\text{fold change})| > 1$ in at least one of the contrasts (i.e. comparing NO⁻ supplies at 0 μM vs. 3 μM , 0 μM vs. 10 μM , or 3 μM vs. 10 μM), and with $P < 0.05$, were considered for further analyses. A partition of differentially expressed genes was performed using a K-mean method, with a number of partitions set to six and a clustering based on a Euclidian distance (Liu et al., 2014). For each group, we sought whether GO terms could be enriched, either by the DAVID method (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (Huang et al., 2007), using the corresponding Refseq gene IDs and with a P value threshold set at 0.1, or using the GOseq R package (Young et al., 2010) with an identical P value threshold. Based on GO-enriched terms, a focused analysis of acyl-lipid pathways and of nitrogen assimilation was performed using a list of gene sequences with curated annotations.

Accession Numbers

Sequences from the *Phaeodactylum* genome analyzed more carefully in this study can be found via Ensembl! under the following accession numbers: Phatr3_EG01524; Phatr3_EG01947; Phatr3_EG01955; Phatr3_EG02208; Phatr3_EG02286; Phatr3_EG02309; Phatr3_EG02454; Phatr3_EG02496; Phatr3_EG02521; Phatr3_EG02619; Phatr3_J10068; Phatr3_J10497; Phatr3_J11319; Phatr3_J11390; Phatr3_J11811; Phatr3_J11916; Phatr3_J12420; Phatr3_J12431; Phatr3_J12642; Phatr3_J12740; Phatr3_J12884; Phatr3_J12902; Phatr3_J13073; Phatr3_J13076; Phatr3_J14202; Phatr3_J15031; Phatr3_J15211; Phatr3_J15730; Phatr3_J16364; Phatr3_J16376; Phatr3_J17086; Phatr3_J17720; Phatr3_J18029; Phatr3_J18064; Phatr3_J18940; Phatr3_J18940; Phatr3_J1971; Phatr3_J19979; Phatr3_J20143; Phatr3_J20310; Phatr3_J20342; Phatr3_J20460; Phatr3_J20508; Phatr3_J21116; Phatr3_J21201; Phatr3_J21988; Phatr3_J22122; Phatr3_J2215; Phatr3_J22274; Phatr3_J22357; Phatr3_J22404; Phatr3_J22459; Phatr3_J22510; Phatr3_J22554; Phatr3_J22677; Phatr3_J22803; Phatr3_J23639; Phatr3_J23850; Phatr3_J23913; Phatr3_J24195; Phatr3_J24610; Phatr3_J24739; Phatr3_J25769; Phatr3_J25932; Phatr3_J26029; Phatr3_J26714; Phatr3_J28009; Phatr3_J28068; Phatr3_J28652; Phatr3_J28797; Phatr3_J29157; Phatr3_J29488; Phatr3_J29702; Phatr3_J30113; Phatr3_J30145; Phatr3_J30282; Phatr3_J30514; Phatr3_J31367; Phatr3_J31440; Phatr3_J31492; Phatr3_J31662; Phatr3_J31994; Phatr3_J31994; Phatr3_J32083; Phatr3_J3262; Phatr3_J32902; Phatr3_J33198; Phatr3_J33435; Phatr3_J33720; Phatr3_J33864; Phatr3_J34485; Phatr3_J34526; Phatr3_J35240; Phatr3_J36821; Phatr3_J37086; Phatr3_J37367; Phatr3_J37652; Phatr3_J38509; Phatr3_J39710; Phatr3_J39949; Phatr3_J40163; Phatr3_J40200; Phatr3_J40261; Phatr3_J40880; Phatr3_J40988; Phatr3_J41423; Phatr3_J41515; Phatr3_J41570; Phatr3_J41886; Phatr3_J41969; Phatr3_J42398; Phatr3_J42683; Phatr3_J42872; Phatr3_J43010; Phatr3_J43099; Phatr3_J43116; Phatr3_J43320; Phatr3_J43352; Phatr3_J43463; Phatr3_J43469; Phatr3_J43678; Phatr3_J43773; Phatr3_J44005; Phatr3_J44028; Phatr3_J44066; Phatr3_J44231; Phatr3_J44401; Phatr3_J44584; Phatr3_J44645; Phatr3_J44806; Phatr3_J44831; Phatr3_J45223; Phatr3_J45510; Phatr3_J45518; Phatr3_J45551; Phatr3_J45758; Phatr3_J45947; Phatr3_J46175; Phatr3_J46453; Phatr3_J46570; Phatr3_J46595; Phatr3_J46830; Phatr3_J47389; Phatr3_J48423; Phatr3_J48664; Phatr3_J48778; Phatr3_J48799; Phatr3_J48859; Phatr3_J48977; Phatr3_J49163; Phatr3_J4918; Phatr3_J49339; Phatr3_J49462; Phatr3_J49524; Phatr3_J49544; Phatr3_J49771; Phatr3_J49867; Phatr3_J50356; Phatr3_J50742; Phatr3_J50770; Phatr3_J51214; Phatr3_J51454; Phatr3_J51519; Phatr3_J52268; Phatr3_J52368; Phatr3_J52648; Phatr3_J5271; Phatr3_J54017; Phatr3_J54068; Phatr3_J54151; Phatr3_J54168; Phatr3_J54222; Phatr3_J54494; Phatr3_J54528; Phatr3_J54709; Phatr3_J54974; Phatr3_J54983; Phatr3_J55069; Phatr3_J55111; Phatr3_J55153; Phatr3_J55157; Phatr3_J55192; Phatr3_J55209; Phatr3_J5527; Phatr3_J7164; Phatr3_J7678; Phatr3_J8663; Phatr3_J8860; Phatr3_J8975; Phatr3_J9255; Phatr3_J9316; Phatr3_J9538; Phatr3_J9619; Phatr3_J9709; Phatr3_J9794; Phatr3_Jdraft559.

SUPPLEMENTAL DATA

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Effect of DD on *P. tricornutum* cells after a 3-h treatment in presence or absence of methanol.

Supplemental Figure S2. Impairment of *Phaeodactylum* photosynthesis following treatment with cPTIO.

Supplemental Figure S3. Verification of NO[•] production by SNAP. A, Membrane inlet mass spectrometer detection of NO[•] (*m/z* = 30 amu).

Supplemental Figure S4. *P. tricornutum* NOA overexpressing lines produce more NO[•]. A, NOA mRNA level in cells transformed with the empty vector (pH4 (EV)) and the NOA overexpression construct.

Supplemental Figure S5. K-mean clustering of differentially expressed genes in response to increasing doses of NO[•].

Supplemental Figure S6. Effect of NOA overexpression on the level of neutral lipids in *Phaeodactylum* cells.

Supplemental Figure S7. Fatty acid distribution in MGDG and TAG in NOAOE4 and wild type.

Supplemental Table S1. Comparison of the effects of DD on *P. tricornutum* obtained in this work with previous studies.

Supplemental Table S2. Comparison of the effects of various compounds on *P. tricornutum* obtained in this work with previous studies.

Supplemental Table S3. *Phaeodactylum* differentially expressed genes following treatments with increasing doses of NO.

Supplemental Table S4. Functional annotation enrichment in *Phaeodactylum* gene clusters differentially expressed following NO treatments using the DAVID method.

Supplemental Table S5. GOseq analysis of GO enrichment in *Phaeodactylum* gene clusters differentially expressed following NO[•] treatments.

Supplemental Table S6. Lipid gene expression following NO treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Giovanni Finazzi and Dimitris Petroustos for fruitful discussions and advices. The authors thank Colleen Murphy for conducting the RNA extractions used for the RNAseq experiments.

Received July 31, 2017; accepted September 13, 2017; published September 18, 2017.

LITERATURE CITED

- Abida H, Dolch LJ, Mei C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, et al (2015) Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* **167**: 118–136
- Allen AE, Dupont CL, Obornik M, Horak A, Nunes-Nesi A, McCrow JP, Zheng H, Johnson DA, Hu H, Fernie AR, et al (2011) Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature* **473**: 203–207
- Allorent G, Courtois F, Chevalier F, Lerbs-Mache S (2013) Plastid gene expression during chloroplast differentiation and dedifferentiation into non-photosynthetic plastids during seed formation. *Plant Mol Biol* **82**: 59–70
- Baker PR, Schopfer FJ, O'Donnell VB, Freeman BA (2009) Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med* **46**: 989–1003
- Berger H, De Mia M, Morisse S, Marchand CH, Lemaire SD, Wobbe L, Kruse O (2016) A light switch based on protein S-nitrosylation fine-tunes photosynthetic light harvesting in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* **171**: 821–832
- Bidle KD (2015) The molecular ecophysiology of programmed cell death in marine phytoplankton. *Ann Rev Mar Sci* **7**: 341–375
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otiillar RP, et al (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**: 239–244
- Buseman CM, Tamura P, Sparks AA, Baughman EJ, Maatta S, Zhao J, Roth MR, Esch SW, Shah J, Williams TD, et al (2006) Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **142**: 28–39
- Butler WL, Kitajima M (1975) Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **376**: 116–125

- Casotti R, Mazza S, Brunet C, Vantrepotte V, Ianora A, Miralto A (2005) Growth inhibition and toxicity of the diatom aldehyde 2-trans, 4-trans-decadienal on *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J Phycol* **41**: 7–20
- Chow F, Pedersen M, Oliveira MC (2013) Modulation of nitrate reductase activity by photosynthetic electron transport chain and nitric oxide balance in the red macroalga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* **25**: 1847–1853
- Cooksey KE, Guckert B, Williams SA, Callis PR (1987) Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *J Microbiol Methods* **6**: 333–345
- De Martino A, Meichenin A, Shi J, Pan K, Bowler C (2007) Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *J Phycol* **43**: 992–1009
- Demé B, Cataye C, Block MA, Marechal E, Jouhet J (2014) Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J* **28**: 3373–3383
- de Montaigu A, Sanz-Luque E, Galvan A, Fernandez E (2010) A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **22**: 1532–1548
- De Riso V, Raniello R, Maumus F, Rogato A, Bowler C, Falciatore A (2009) Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Res* **37**: e96
- Di Dato V, Musacchia F, Petrosino G, Patil S, Montresor M, Sanges R, Ferrante MI (2015) Transcriptome sequencing of three *Pseudo-nitzschia* species reveals comparable gene sets and the presence of Nitric Oxide Synthase genes in diatoms. *Sci Rep* **5**: 12329
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15–21
- Dolch LJ, Marechal E (2015) Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Drugs* **13**: 1317–1339
- Engström PG, Steijger T, Sipos B, Grant GR, Kahles A, Ratsch G, Goldman N, Hubbard TJ, Harrow J, Guigo R, et al (2013) Systematic evaluation of spliced alignment programs for RNA-seq data. *Nat Methods* **10**: 1185–1191
- Eroglu E, Gottschalk B, Charoensin S, Blass S, Bischof H, Rost R, Madreiter-Sokolowski CT, Pelzmann B, Bernhart E, Sattler W, et al (2016) Development of novel FP-based probes for live-cell imaging of nitric oxide dynamics. *Nat Commun* **7**: 10623
- Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C (1999) Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. *Mar Biotechnol* (NY) **1**: 239–251
- Falciatore A, d'Alcala MR, Croot P, Bowler C (2000) Perception of environmental signals by a marine diatom. *Science* **288**: 2363–2366
- Fazzari M, Trotschansky A, Schopfer FJ, Salvatore SR, Sanchez-Calvo B, Vitturi D, Valderrama R, Barroso JB, Radi R, Freeman BA, et al (2014) Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes. *PLoS One* **9**: e84884
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, et al (2013) The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**: 20130164
- Frada MJ, Burrows EH, Wyman KD, Falkowski PG (2013) Quantum requirements for growth and fatty acid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) in nitrogen replete and limited conditions. *J Phycol* **49**: 381–388
- Gallardo L, Rhodes H (1997) Oxidized nitrogen in the remote pacific: the role of electrical discharges over the oceans. *J Atmos Chem* **26**: 147–168
- Gas E, Flores-Perez U, Sauret-Gueto S, Rodriguez-Concepcion M (2009) Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism. *Plant Cell* **21**: 18–23
- Gerrard W (1980) Gas solubilities widespread applications. Pergamon Press, Oxford, p 497
- Guerra LT, Levitan O, Frada MJ, Sun JS, Falkowski PG, Dismukes GC (2013) Regulatory branch points affecting protein and lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biomass Bioenergy* **59**: 306–315
- Holloway JM, Dahlgren RA (2002) Nitrogen in rock: occurrences and biogeochemical implications. *Global Biogeochem Cyc* **16**: 65–61–65–17.
- Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, Bryant D, Guo Y, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, et al (2007) DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res* **35**: W169–W175
- IPCC (2014) *Clim Change 2014: Synthesis Report*. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland

- Jin CW, Du ST, Zhang YS, Lin XY, Tang CX (2009) Differential regulatory role of nitric oxide in mediating nitrate reductase activity in roots of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Ann Bot* **104**: 9–17
- Johnson X, Vandystadt G, Bujaldon S, Wollman FA, Dubois R, Roussel P, Alric J, Beal D (2009) A new setup for in vivo fluorescence imaging of photosynthetic activity. *Photosynth Res* **102**: 85–93
- Jouhet J, Marechal E, Bligny R, Joyard J, Block MA (2003) Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett* **544**: 63–68
- Kampschreur MJ, Temmink H, Kleerebezem R, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM (2009) Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Res* **43**: 4093–4103
- Keszler A, Zhang Y, Hogg N (2010) Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: How are S-nitrosothiols formed? *Free Radic Biol Med* **48**: 55–64
- Kikkert JR (1993) The Biolistic(R) Pds-1000 He Device. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **33**: 221–226
- Kohlwein SD (2010) Triacylglycerol homeostasis: insights from yeast. *J Biol Chem* **285**: 15663–15667
- Kumar A, Castellano I, Patti FP, Palumbo A, Buia MC (2015) Nitric oxide in marine photosynthetic organisms. *Nitric Oxide* **47**: 34–39
- Levitan O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG (2014) Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends Biotechnol* **32**: 117–124
- Levitan O, Dinamarca J, Zelzion E, Gorbunov MY, Falkowski PG (2015a) An RNA interference knock-down of nitrate reductase enhances lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant J* **84**: 963–973
- Levitan O, Dinamarca J, Zelzion E, Lun DS, Guerra LT, Kim MK, Kim J, Van Mooy BA, Bhattacharya D, Falkowski PG (2015b) Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 412–417
- Liu T, Zhang S, Chen J, Jiang K, Zhang Q, Guo K, Liu Y (2014) The transcriptional profiling of glycogenes associated with hepatocellular carcinoma metastasis. *PLoS One* **9**: e107941
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275
- Mandal MK, Chandra-Shekar AC, Jeong RD, Yu K, Zhu S, Chanda B, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P (2012) Oleic acid-dependent modulation of NITRIC OXIDE ASSOCIATED1 protein levels regulates nitric oxide-mediated defense signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 1654–1674
- Maréchal E, Block MA, Joyard J, Douce R (1994a) Comparison of the kinetic properties of MGDG synthase in mixed micelles and in envelope membranes from spinach chloroplast. *FEBS Lett* **352**: 307–310
- Maréchal E, Block MA, Joyard J, Douce R (1994b) Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *J Biol Chem* **269**: 5788–5798
- Maréchal E, Miede C, Block MA, Douce R, Joyard J (1995) The catalytic site of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. Biochemical analysis of the structure and of the metal content. *J Biol Chem* **270**: 5714–5722
- Martens-Habbena W, Qin W, Horak RE, Urakawa H, Schauer AJ, Moffett JW, Armbrust EV, Ingalls AE, Devol AH, Stahl DA (2015) The production of nitric oxide by marine ammonia-oxidizing archaea and inhibition of archaeal ammonia oxidation by a nitric oxide scavenger. *Environ Microbiol* **17**: 2261–2274
- Mei CE, Cussac M, Haslam RP, Beaudoin F, Wong YS, Marechal E, Rébeillé F (2017) C1 metabolism inhibition and nitrogen deprivation trigger triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* cell cultures and highlight the role of NPC in phosphatidylcholine-to-triacylglycerol pathway. *Front Plant Sci* doi: 10.3389/fpls.2016.02014
- Michalski G, Bhattachary SK, Girsh G (2014) NOx cycle and the tropospheric ozone isotope anomaly: an experimental examination. *Atmos Chem Phys* **14**: 4935–4953
- Miller MR, Megson IL (2007) Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol* **151**: 305–321
- Miller R, Wu G, Deshpande RR, Vieler A, Gartner K, Li X, Moellering ER, Zauner S, Cornish AJ, Liu B, et al (2010) Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiol* **154**: 1737–1752
- Miralto A, Barone G, Romano G, Poulet SA, Ianora A, Russo GL, Buttino I, Mazzarella G, Laabir M, Cabrini M, et al (1999) The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature* **402**: 173–176
- Misra AN, Misra M, Singh R (2012) Chlorophyll fluorescence in plant biology. In AN Misra, ed, *Biophysics*. InTech, Rijeka, Croatia, pp 171–192
- Moreau M, Lee GI, Wang Y, Crane BR, Klessig DF (2008) AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **283**: 32957–32967
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF (2010) NO synthesis and signaling in plants—where do we stand? *Physiol Plant* **138**: 372–383
- Naqvi SWA, Yoshinari T, Jayakumar DA, Altabet MA, Narvekar PV, Devol AH, Brandes JA, Codispoti LA (1998) Budgetary and biogeochemical implications of N₂O isotope signatures in the Arabian Sea. *Nature* **394**: 462–464
- Nicholls JC, Davies CA, Trimmer M (2007) High-resolution profiles and nitrogen isotope tracing reveal a dominant source of nitrous oxide and multiple pathways of nitrogen gas formation in the central Arabian sea. *Limnol Oceanogr* **52**: 156–168
- Olasehinde EF, Takeda K, Sakugawa H (2010) Photochemical production and consumption mechanisms of nitric oxide in seawater. *Environ Sci Technol* **44**: 8403–8408
- Pan Y, Ni BJ, Lu H, Chandran K, Richardson D, Yuan Z (2015) Evaluating two concepts for the modelling of intermediates accumulation during biological denitrification in wastewater treatment. *Water Res* **71**: 21–31
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384–394
- Rainteau D, Humbert L, Delage E, Vergnolle C, Cantrel C, Maubert MA, Lanfranchi S, Maldiney R, Collin S, Wolf C, 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
- Ribalet F, Bastianini M, Vidoudez C, Acri F, Berges J, Ianora A, Miralto A, Pohnert G, Romano G, Wichard T, et al (2014) Phytoplankton cell lysis associated with polyunsaturated aldehyde release in the Northern Adriatic Sea. *PLoS One* **9**: e85947
- Ribalet F, Berges JA, Ianora A, Casotti R (2007) Growth inhibition of cultured marine phytoplankton by toxic algal-derived polyunsaturated aldehydes. *Aquat Toxicol* **85**: 219–227
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**: 103–110
- Sakihama Y, Nakamura S, Yamasaki H (2002) Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol* **43**: 290–297
- Sánchez-Calvo B, Barroso JB, Corpas FJ (2013) Hypothesis: nitro-fatty acids play a role in plant metabolism. *Plant Sci* **199**: 200: 1–6
- Sanz-Luque E, Chamizo-Ampudia A, Llamas A, Galvan A, Fernandez E (2015) Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front Plant Sci* **6**: 899
- Sanz-Luque E, Ocana-Calahorra F, Llamas A, Galvan A, Fernandez E (2013) Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot* **64**: 3373–3383
- Siaut M, Heijde M, Mangogna M, Montsant A, Coesel S, Allen A, Manfredonia A, Falcatore A, Bowler C (2007) Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricorutum*. *Gene* **406**: 23–35
- Simionato D, Block MA, La Rocca N, Jouhet J, Marechal E, Finazzi G, Morosinotto T (2013) The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryot Cell* **12**: 665–676
- St Laurent CD, Moon TC, Befus AD (2015) Measurement of nitric oxide in mast cells with the fluorescent indicator DAF-FM diacetate. *Methods Mol Biol* **1220**: 339–345
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**: 835–841
- Tiselius P, Kuylenstierna M (1996) Growth and decline of a diatom spring bloom: phytoplankton species composition, formation of marine snow and the role of heterotrophic dinoflagellates. *J Plankton Res* **18**: 133–155
- Vardi A (2008) Cell signaling in marine diatoms. *Commun Integr Biol* **1**: 134–136

- Vardi A, Bidle KD, Kwityn C, Hirsh DJ, Thompson SM, Callow JA, Falkowski P, Bowler C (2008) A diatom gene regulating nitric-oxide signaling and susceptibility to diatom-derived aldehydes. *Curr Biol* **18**: 895–899
- Vardi A, Formigini F, Casotti R, De Martino A, Ribalet F, Miralto A, Bowler C (2006) A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatoms. *PLoS Biol* **4**: e60
- Varet H, Brillet-Gueguen L, Coppee JY, Dillies MA (2016) SARTools: a DESeq2- and EdgeR-Based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. *PLoS One* **11**: e0157022
- Vunjak-Novakovic G, Kim Y, Wu XX, Berzin I, Merchuk JC (2005) Air-lift bioreactors for algal growth on flue gas: mathematical modeling and pilot-plant studies. *Ind Eng Chem Res* **44**: 6154–6163
- Wei L, Derrien B, Gautier A, Houille-Vernes L, Boulouis A, Saint-Marcoux D, Malnoe A, Rappaport F, de Vitry C, Vallon O, et al (2014) Nitric oxide-triggered remodeling of chloroplast bioenergetics and thylakoid proteins upon nitrogen starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **26**: 353–372
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 177–183
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ* **31**: 622–631
- Yamasaki H, Sakihama Y (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* **468**: 89–92
- Yang J, Pan YF, Bowler C, Zhang LX, Hu HH (2016) Knockdown of phosphoenolpyruvate carboxykinase increases carbon flux to lipid synthesis in *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res* **15**: 50–58
- Yang ZK, Zheng JW, Niu YF, Yang WD, Liu JS, Li HY (2014) Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress. *Environ Microbiol* **16**: 1793–1807
- Yoneda K, Yoshida M, Suzuki I, Watanabe MM (2016) Identification of a major lipid droplet protein in a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Cell Physiol* **57**: 397–406
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* **11**: R14
- Zehr JP, Ward BB (2002) Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1015–1024
- Zhang Z, Xing L, Wu Z, Liu C, Lin C, Liu L (2006) Discovery of nitric oxide in marine ecological system and the chemical characteristics of nitric oxide. *Sci. Cina Ser B Chem*. **49**: 475–481
- Zhu W, Xiao S, Zhang D, Liu P, Zhou H, Dai W, Liu F, Li H (2015) Highly efficient and stable Au/CeO₂-TiO₂ photocatalyst for nitric oxide abatement: potential application in flue gas treatment. *Langmuir* **31**: 10822–10830

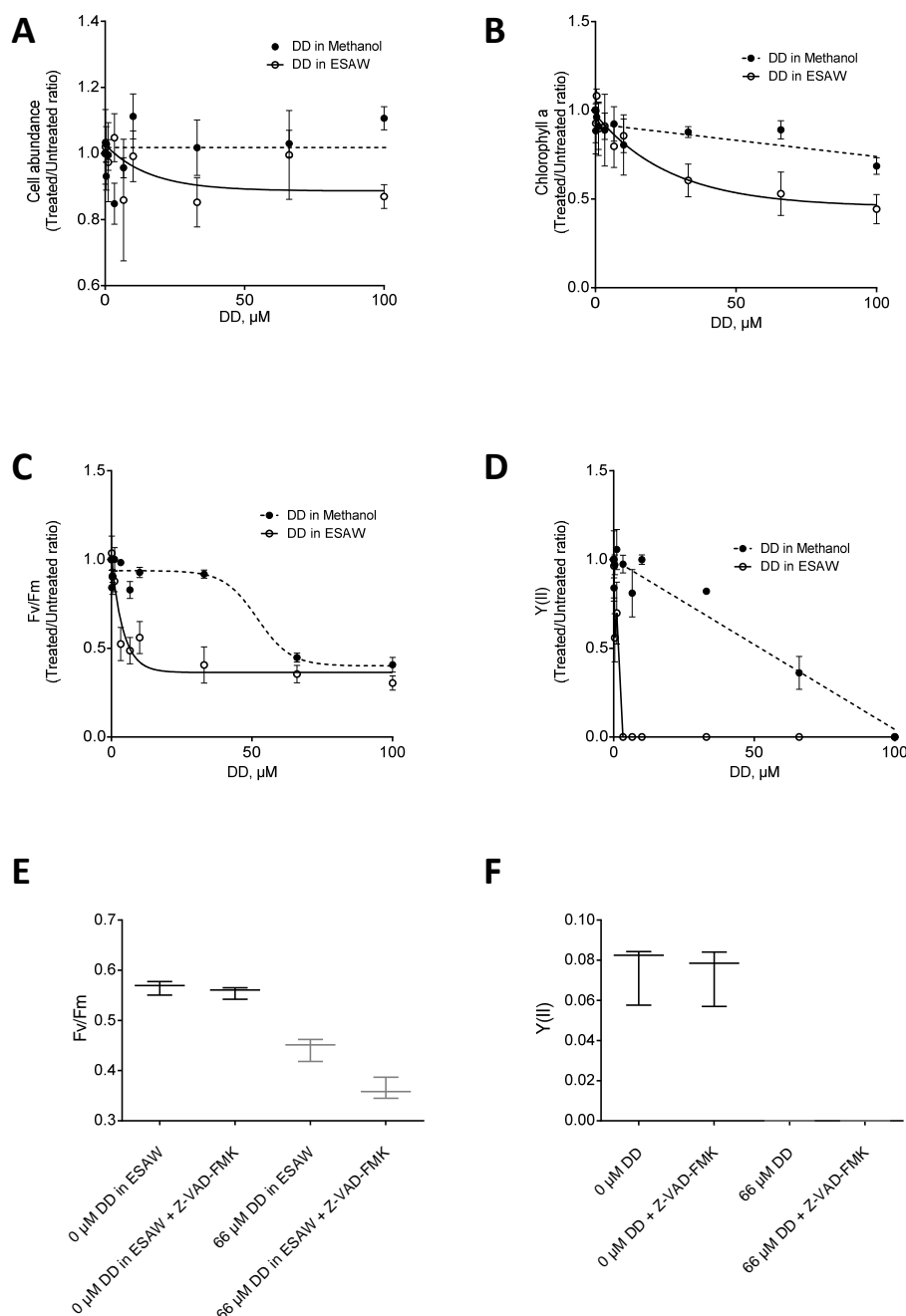


Figure S1. Effect of 2E,4E-decadienal (DD) on *Phaeodactylum tricornutum* cells, after a 3-hour treatment in presence or absence of methanol. *Phaeodactylum* cells (1.2×10^6 cells.mL⁻¹) were incubated with 0.1, 0.4, 1.1, 3.3, 6.6, 10, 33, 66 or 100 μM DD, or cells were left untreated (0 μM DD). Experiments were performed in ESAW, in presence or absence of methanol 0.5% used as a vector for DD. Values correspond to 3 independent experiments. **A. Cell abundance.** The abundance of cells was expressed compared to untreated control. **B. Chlorophyll a.** Levels of chlorophyll a were determined as described in the methods section and expressed compared to untreated control. **C. Photosystem II quantum efficiency (*Fv/Fm*).** *Fv/Fm* was measured *via* chlorophyll fluorescence as described in the method section and expressed compared to untreated control. **D. Photochemical quenching capacity (*Y(II)*).** *Y(II)* was measured as described in the method section and expressed compared to untreated control. **E. and F. Effect of the caspase/metacaspase inhibitor carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) on the impairment of photosystem II quantum efficiency (*Fv/Fm*) and photochemical quenching capacity (*Y(II)*) by DD.** *Phaeodactylum* cells (1.2×10^6 cells.mL⁻¹) were incubated with 0 or 66 μM DD in the absence or presence of Z-VAD-FMK. Values correspond to 3 biological replicates.

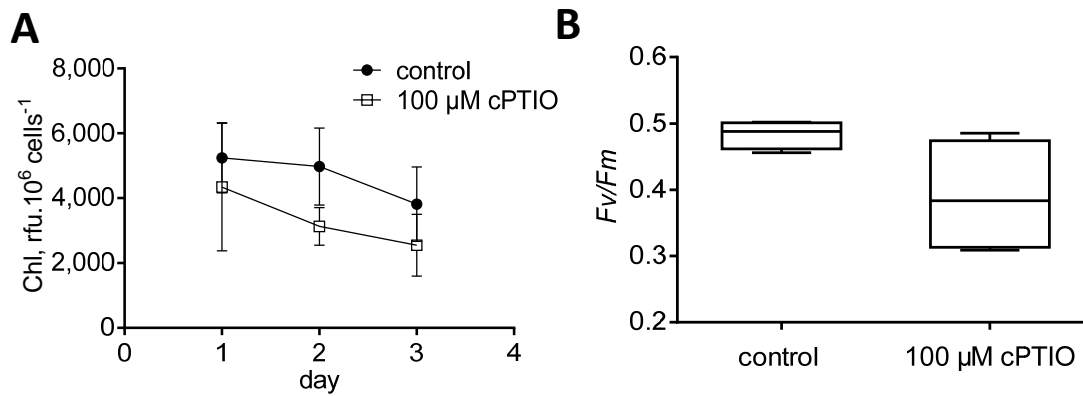


Figure S2. Impairment of *Phaeodactylum* photosynthesis following treatment with cPTIO. *Phaeodactylum* cells inoculated at 5.10^5 cell.mL⁻¹ were cultivated in presence or absence of carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO), known to act as an antidote to NO[•]. **A. Chlorophyll content.** At indicated time points, a 160 μL culture aliquot was collected for measurements. Spectrophotometric measurement of fluorescence was performed at 680 nm at room temperature. **B. PSII quantum efficiency.** *Fv/Fm* was measured after three days in presence of cPTIO, via chlorophyll fluorescence as described in the method section. Values correspond to three independent experiments.

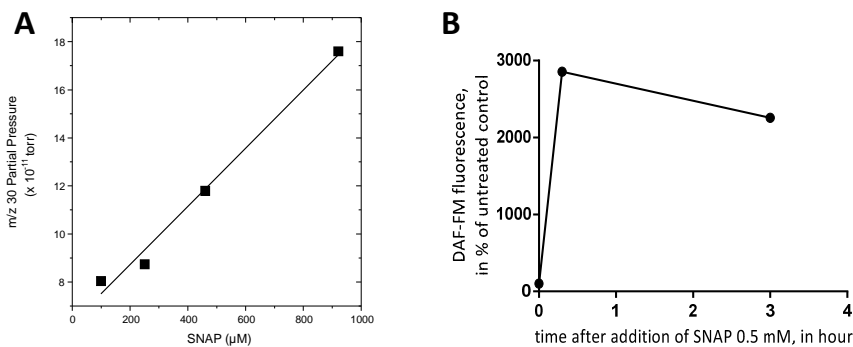


Figure S3. Verification of NO[•] production by S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP). **A. Membrane inlet mass spectrometer detection of NO[•] (m/z = 30 amu).** Stock solutions of SNAP were prepared in DMSO and added to the mass spectrometer cuvette with a gas-tight syringe to give concentrations ranging from 80 to 920 μM. The intensity of the signal corresponding to NO[•] (m/z = 30) increased linearly with the concentration of dissolved SNAP. **B. DAF-FM detection of the emission of NO[•] by SNAP.** A concentration of 10 μM DAF-FM (100% DMSO, Sigma) was added to a culture inoculated at 20^6 cells.mL⁻¹. After dark incubation and washing, 500 μL culture aliquots were spread and 0.5 mM S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) (100 mM stock solution in H₂O) was added. DAF-FM fluorescence was measured after 30 minutes and after 3 hours, illustrating the stability of NO[•] produced by SNAP in this time range.

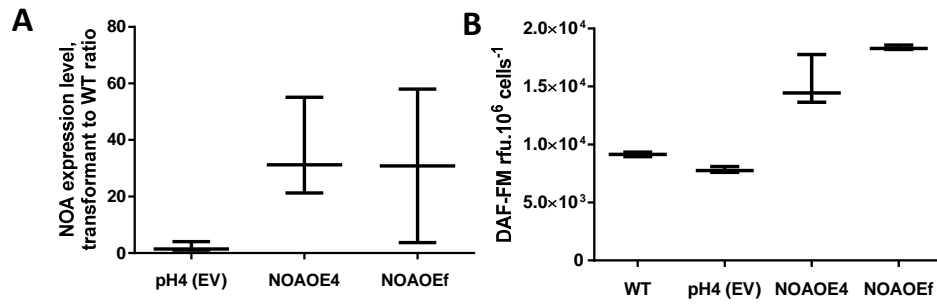


Figure S4. *Phaeodactylum tricornutum* NOA overexpressing lines produce more NO[•]. **A. NOA mRNA level in cells transformed with the empty vector (pH4 (EV)) and the NOA overexpression construct.** RNA was extracted from a 10⁸-cell pellet and reversely transcribed. Quantitative real time PCR was conducted on 20 ng cDNA using oligonucleotides binding *TUB* and *RPS* as internal controls and *NOA*. **B. NO[•] production in NOA overexpressing lines measured via fluorescence of DAF-FM.** Cultures of the respective lines were inoculated at 2.10⁶ cells.mL⁻¹. DAF-FM was added at a concentration of 10 μM. After dark incubation and washing, cells were collected into 500 μL aliquots and fluorescence was measured after three hours of incubation.

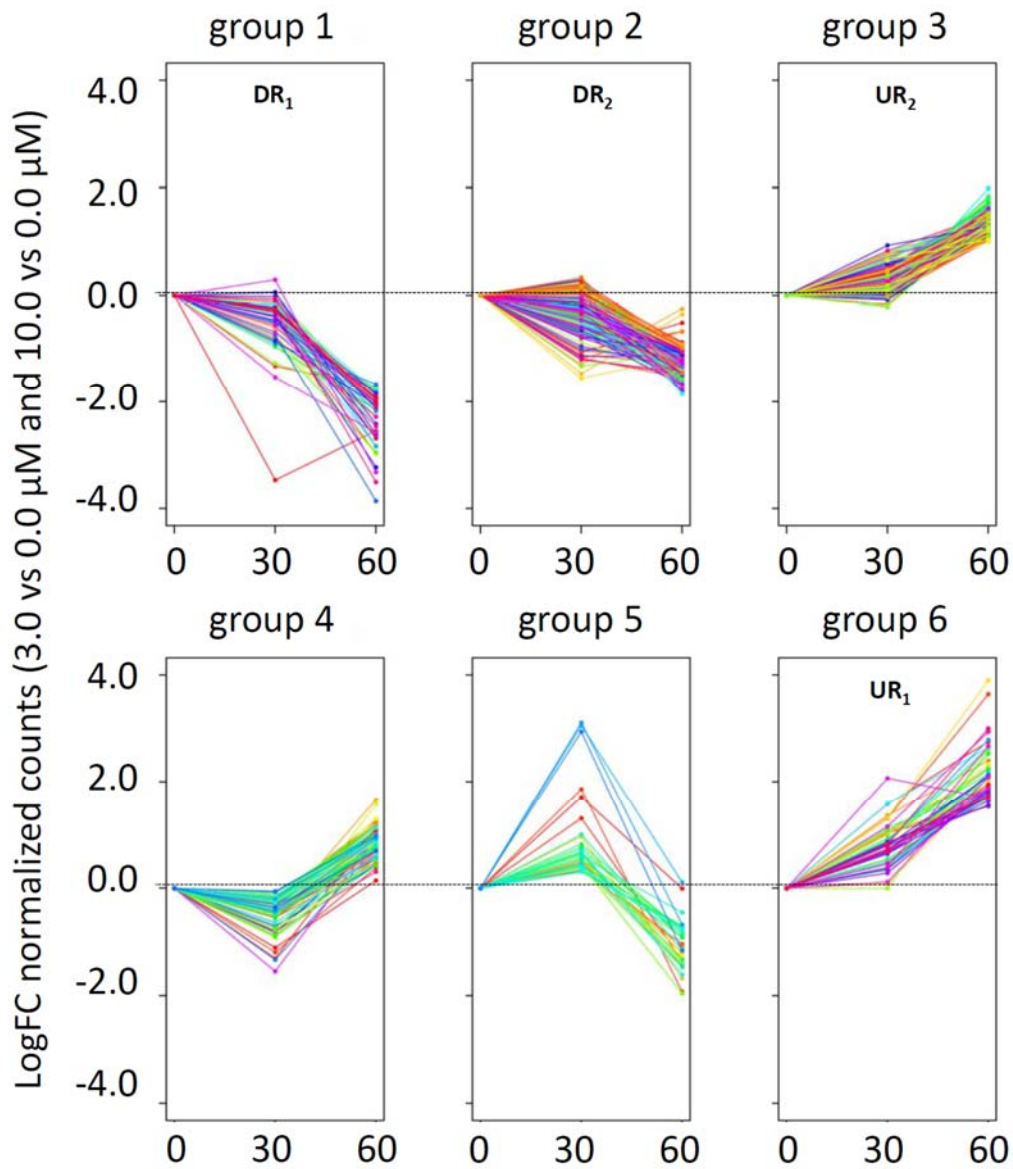


Figure S5: K-mean clustering of differentially expressed genes in response to increasing doses of NO[•]. Only genes being differentially expressed with a $|\text{Log}_2(\text{fold change})| > 1$ in at least one of the contrasts (i.e. comparing NO[•] supplies at 3 μM vs. 0 μM , 10 μM vs. 0 μM or 10 μM vs. 3 μM), and with p-value lower than 0.05, were considered for further analyses. A partition of differentially expressed genes was performed using a K-mean method, with a number of partitions set to 6 and a clustering based on a Euclidian distance (Liu et al., 2014). Two clusters comprise genes downregulated following NO[•] treatments, i.e. group 1 (DR₁) gathering genes with the strongest magnitude in expression decline (in the -2 to -4 Log₂FC range) and group 2 (DR₂) with moderate but significant expression decline (Log₂FC ~ -1). Likewise, two clusters comprise genes upregulated following NO[•] treatments, i.e. group 6 (UR₁) gathering genes with the strongest magnitude in expression increase (in the +2 to +4 Log₂FC range) and group 3 (DR₂) with moderate but significant expression increase (Log₂FC ~ +1).

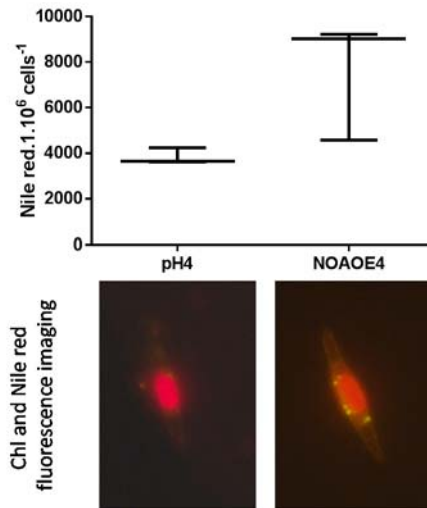


Figure S6: Effect of *NOA* overexpression on the level of neutral lipids in *Phaeodactylum* cells. Nile red staining and fluorescence quantification were performed on a 300 μL aliquot of three day old 50 mL-culture inoculated at 10^6 cells.mL⁻¹. Data are the results of three independent biological replicates. A representative cell is shown for each line. These samples were used for complete glycerolipid profiling.

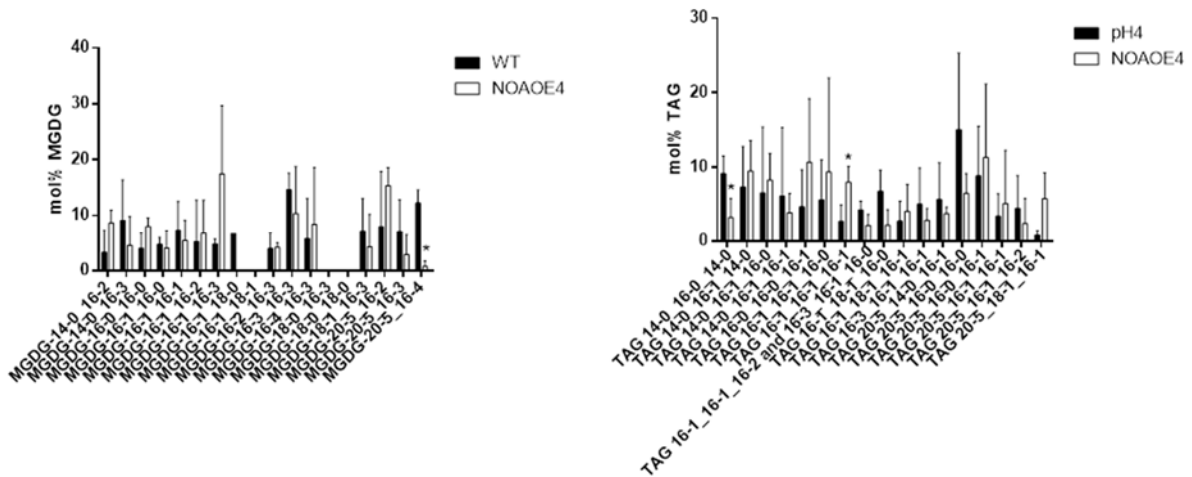


Figure S7: Fatty acid distribution in MGDG and TAG in NOAOE4 and WT. Three day old 50 mL cultures inoculated at 10^6 cells.mL⁻¹ were harvested and lipids extracted. Glycerolipid fatty acid compositions were revealed by HPLC-MS/MS as described previously (Abida et al., 2015). MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; TAG, triacylglycerol.

Table S1. Comparison of the effects of DD on *Phaeodactylum tricornutum* obtained in the present work, with previous studies.

	without methanol (this study)	in presence of methanol (this study)	Previous reports, in presence of methanol (Vardi et al., 2006; Vardi et al., 2008)
DD concentration triggering an apparent decrease of cells after a 3-hour treatment	3.3 μ M	>100 μ M	20 μ M
DD concentration triggering a decline of chlorophyll a per cell concentration to half the value in untreated cells	33 μ M	>100 μ M	nd
DD concentration triggering a decline of F_v/F_m to half the value of untreated cells	3.3 μ M	66 μ M	nd
DD concentration triggering a complete disruption of the photochemical quenching capacity ($Y(II) = 0$)	3.3 μ M	100 μ M	nd

Table S2. Comparison of the effects of various compounds on *Phaeodactylum tricornutum* obtained in the present work, with previous studies.

	This work	Previous reports (Vardi et al., 2006; Vardi et al., 2008)
Effect of the caspase/metacaspase inhibitor Z-VAD-FMK on <i>P. tricornutum</i> cells treated with DD.	Z-VAD-FMK (20 μ M) increases the impairment of photosynthesis efficiency (F_m/F_m) triggered by DD and has no effect on the disruption of photochemical quenching capacity ($Y(II)$) by DD. Z-VAD-FMK does not decrease DD-induced cell death.	Z-VAD-FMK decreases DD-induced cell death (no mention of used concentration).
Effect of cPTIO (NO scavengers) on <i>P. tricornutum</i> cells	cPTIO (10 to 100 μ M) is toxic (decline of F_v/F_m to half the value of untreated cells)	cPTIO was reported to rescue the growth phenotype of <i>P. tricornutum</i> expressing a NO producing gene
Effect of NO synthase (NOS) inhibitors (non-metabolized arginine analogues) on NO production	No visible effect (consistent with the absence of NOS genes in the genome of <i>P. tricornutum</i>)	Inhibition of NO production, suggesting the presence of a NOS enzyme.

References:

- Abida H, Dolch LJ, Mei C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, Rebeille F, Petroutsos D, Jouhet J, Marechal E (2015) Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* **167**: 118-136
- Liu T, Zhang S, Chen J, Jiang K, Zhang Q, Guo K, Liu Y (2014) The transcriptional profiling of glycogenes associated with hepatocellular carcinoma metastasis. *PLoS One* **9**: e107941
- Vardi A, Bidle KD, Kwityn C, Hirsh DJ, Thompson SM, Callow JA, Falkowski P, Bowler C (2008) A diatom gene regulating nitric-oxide signaling and susceptibility to diatom-derived aldehydes. *Curr Biol* **18**: 895-899
- Vardi A, Formiggini F, Casotti R, De Martino A, Ribalet F, Miralto A, Bowler C (2006) A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatoms. *PLoS Biol* **4**: e60

Les Supplemental Tables (S3,S4, S5 et S6) sont disponibles à l'adresse suivante :

<http://www.plantphysiol.org/content/175/3/1407/tab-figures-data>

Chapitre 3 :
Détection d'oxylipines
non-enzymatiques chez
Phaeodactylum tricornutum
en réponse à un stress oxydant

1. Préambule

Les oxylipines sont des composés oxygénés synthétisés à partir d'acides gras (Gerwick et al., 1991). Ce sont des molécules ubiquitaires que l'on retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Chez les animaux, les oxylipines sont regroupés sous le nom d'eicosanoïdes car ils dérivent d'acides gras à vingt carbones. Chez les plantes, les oxylipines sont des molécules de signalisation impliquées dans la défense contre des pathogènes et des organismes herbivores (Blée, 1998). L'acide jasmonique (JA) et ses esters sont les oxylipines les plus étudiés chez les plantes supérieures (Howe, 2018, Wasternack & Feussner, 2018).

La synthèse des oxylipines peut-être réalisée selon deux voies :

- 1) une voie enzymatique, la plus étudiée, pouvant impliquer entre autres des cyclooxygénases (COX) chez les animaux ainsi que des lipoxygénases (LOX), des allene oxide synthases (AOS) et des allene oxide cyclases (AOC) chez les plantes (pour revue, Wasternack & Feussner, 2018).
- 2) une voie non-enzymatique nécessitant la présence d'espèces radicalaires tels que les radicaux libres OH^\cdot et d'au moins trois doubles liaisons sur l'acide gras polyinsaturés (PUFAs). Cette voie de synthèse forme les isoprostanoïdes. Les isoprostanoïdes sont divisés en plusieurs familles selon leur PUFA précurseur :
 - Les phytoprostanes (PhytoPs) provenant de la peroxydation radicalaire de l'acide α -linoléinique (ALA, C18:3) (Parchmann & Mueller, 1998)
 - Les F_{2t} -isoprostanes (F_{2t} -IsoPs) provenant de la peroxydation radicalaire de l'acide arachidonique (ARA, C20:4) (Morrow et al., 1990).
 - Les F_{3t} -isoprostanes dérivant la peroxydation radicalaire de l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5) (Guy et al., 2014).
 - Les F_{4t} -Neuroprostanes (F_{4t} -NeuroPs) issus de la peroxydation radicalaire de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6) (Nourooz-Zadeh et al., 1998, Roberts II et al., 1998, Guy et al., 2014).

Le modèle *Phaeodactylum* ne présente apparemment pas de machinerie enzymatique permettant la synthèse des oxylipines. Cette absence n'est pas une généralité car la machinerie enzymatique a été détectée et décrite chez *Skeletonema* (Gerecht et al., 2011, Gallina et al., 2015, Di Dato et al., 2017). La détection d'acides gras oxydés, chez *Phaeodactylum*, après un traitement avec 150 μM de H_2O_2 (Collins et al., 2016). Par ailleurs, l'identification de composés (misoprostol, azapropazone, meloxicam) issus du crible de petites molécules présenté dans l'article 1 de ce mémoire (Conte et al., 2018) favorisant

l'accumulation de TAG et connus pour interférer avec des récepteurs d'oxylipines chez les animaux, suggère l'existence de cette catégorie de molécules de signalisation chez *Phaeodactylum*.

L'article 3 présente la détection d'isoprostanoïdes chez *Phaeodactylum* après un traitement avec du peroxyde d'hydrogène. L'étude s'oriente dans un premier temps sur la recherche de PUFAs précurseurs de ces isoprostanoïdes. Le profil des acides gras totaux de *Phaeodactylum* présente quatre précurseurs possibles : l'acide eicosapentaénoïque (C20:5) comme PUFA majoritaire suivi de l'acide α -linoléique (C18:3), de l'acide arachidonique (C20:4) et de l'acide docosahexaénoïque (C22:6). Par spectrométrie de masse, nous avons détecté la présence six phytoprostanes (*ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-PhytoP, 9-F_{1t}-PhytoP, *ent*-16-B_{1t}-PhytoP, *ent*-9-L_{1t}-PhytoP, 16(RS)-16-A_{1t}-PhytoP ainsi qu'un mélange racémique de 16-F_{1t}-PhytoP + 9-*epi*-9-F_{1t}-PhytoP) dérivant de la peroxydation du C18:3, trois F_{2t}-Isoprostanes (15-F_{2t}-IsoP, 15-*epi*-15-F_{2t}-IsoP et 5(RS)-5-F_{2t}-IsoP) dérivant du C20:4, deux F_{3t}-Isoprostanes (8-F_{3t}-IsoP et 8-*epi*-8-F_{3t}-IsoP) dérivant du C20:5 et trois F_{4t}-NeuroPs (10-F_{4t}-NeuroP, 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP et 4(RS)-4-F_{4t}-NeuroP) dérivant du 22:6. Les F_{1t}-Phytoprostanes constituent la famille majoritaire d'isoprostanoïdes (300 pmol/10⁶ cellules ou environ 4 μ M), dérivant du 18:3, qui est un PUFA peu abondant chez *Phaeodactylum*. Nous montrons dans l'article 3 que la phosphatidylcholine (PC) et le diacylglycerylhydroxymethyl-trimethyl-alanine (DGTA) sont les deux seuls glycérolipides capables de fournir tous les acides gras nécessaires à la production des isoprostanoïdes que nous observons.

Les cellules de *Phaeodactylum* ont été traitées avec neuf isoprostanoïdes synthétiques dans une gamme de concentrations comprise entre 0 et 50 μ M : une diminution de la concentration cellulaire de 10 à 20 % ainsi qu'une augmentation de l'accumulation des TAG, détectée par un marquage au rouge de Nil sont détectées sans pour autant s'accompagner d'une chute de la capacité photosynthétique. Ces résultats semblent donc indiquer que les isoprostanoïdes pourraient être responsables de l'accumulation de lipides neutres suite à un stress oxydant, mais que l'altération de la photosynthèse par le H₂O₂ est indépendante de ces oxylipines.

Ce chapitre ouvre donc des perspectives de recherche sur le contrôle de processus cellulaires par la signalisation des isoprostanoïdes chez *Phaeodactylum tricornutum* dans divers contextes environnementaux.

2. Article 3

Article 3 : Lupette, J., Jaussaud, A., Vigor, C., Oger, C., Galano, J.M., Réversat, G., Vercauteren, J., Jouhet, J., Durand, T., Maréchal, E. Non enzymatic synthesis of bioactive isoprostanoids in the diatom *Phaeodactylum* following oxidative stress. ***Plant Physiology***. 178:1344-1357.

Non-Enzymatic Synthesis of Bioactive Isoprostanooids in the Diatom *Phaeodactylum* following Oxidative Stress¹

Josselin Lupette,^a Antoine Jaussaud,^a Claire Vigor,^b Camille Oger,^b Jean-Marie Galano,^b Guillaume Réversat,^b Joseph Vercauteren,^b Juliette Jouhet,^a Thierry Durand,^b and Eric Maréchal^{a,2,3}

^aLaboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Unité Mixte de Recherche 5168, Centre National de la Recherche Scientifique, Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Grenoble Alpes, Institut de Biosciences Biotechnologies de Grenoble, Commissariat à l'Énergie Atomique Grenoble, 38000 Grenoble, France

^bInstitut des Biomolécules Max Mousseron, Unité Mixte de Recherche 5247, Université de Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, F-34093 Montpellier cedex 05, France

ORCID IDs: 0000-0002-7842-575X (J.L.); 0000-0002-0755-4140 (A.J.); 0000-0002-0201-1235 (J.V.); 0000-0002-0060-1696 (E.M.)

The ecological success of diatoms requires a remarkable ability to survive many types of stress, including variations in temperature, light, salinity, and nutrient availability. On exposure to these stresses, diatoms exhibit common responses, including growth arrest, impairment of photosynthesis, production of reactive oxygen species, and accumulation of triacylglycerol (TAG). We studied the production of cyclopentane oxylipins derived from fatty acids in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* in response to oxidative stress. *P. tricorutum* lacks the enzymatic pathway for producing cyclopentane-oxylipins, such as jasmonate, prostaglandins, or thromboxanes. In cells subjected to increasing doses of hydrogen peroxide (H₂O₂), we detected nonenzymatic production of isoprostanooids, including six phytoprostanes, three F_{2t}-isoprostanes, two F_{3t}-isoprostanes, and three F_{4t}-neuroprostanes, by radical peroxidation of α -linolenic, arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexanoic acids, respectively. H₂O₂ also triggered photosynthesis impairment and TAG accumulation. F_{1t}-phytoprostanes constitute the major class detected (300 pmol per 1 million cells; intracellular concentration, ~4 μ M). Only two glycerolipids, phosphatidylcholine and diacylglyceryl-hydroxymethyl-trimethyl-alanine, could provide all substrates for these isoprostanooids. Treatment of *P. tricorutum* with nine synthetic isoprostanooids produced an effect in the micromolar range, marked by the accumulation of TAG and reduced growth, without affecting photosynthesis. Therefore, the emission of H₂O₂ and free radicals upon exposure to stresses can lead to glycerolipid peroxidation and nonenzymatic synthesis of isoprostanooids, inhibiting growth and contributing to the induction of TAG accumulation via unknown processes. This characterization of nonenzymatic oxylipins in *P. tricorutum* opens a field of research on the study of processes controlled by isoprostanooid signaling in various physiological and environmental contexts in diatoms.

Diatoms are an important group of phytoplankton widespread in freshwaters and oceans. In addition to the carbon cycle, in which they are critical for CO₂ capture (Scala and Bowler, 2001), they play significant roles in other geochemical cycles via the biogenic

conversion of nitrogen (Dolch et al., 2017; McCarthy et al., 2017) or silica (Benoiston et al., 2017). They are at the base of the aquatic microbial food web and are grazed by copepods and juvenile invertebrates (Buchan et al., 2014). Their ecological success requires a remarkable ability to cope with all types of stress, including biotic interactions with grazers, resistance to physicochemical variations, such as temperature, light, salinity, and nutrient availability, and exposure to a multitude of toxic compounds, including anthropogenic pollutants (Conte et al., 2018). Studies in diatoms have benefited from developments in the model species *Phaeodactylum tricorutum*, whose lipidome has been fully characterized under various stress conditions (Abida et al., 2015).

Common responses in diatoms to a variety of stresses include growth arrest (Abida et al., 2015; Collins et al., 2016; Conte et al., 2018), photosynthesis impairment and activation of photoprotection (Roháček et al., 2014; Taddei et al., 2016), emission of reactive oxygen species (ROS; Allen et al., 2008; Burch and Franz, 2016; Collins et al., 2016), and extensive remodeling of membrane glycerolipids (Abida et al., 2015; Collins et al., 2016; Conte et al., 2018).

¹This work was supported by a Flagship program from the CEA High Commissioner, a CEA DRF Impulsion program, and “Investissements d’avenir” programs funded by the French National Research Agency (ANR-10-LABEX-04 GRAL Labex, Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology; ANR-11-BTBR-0008 Oceanomics and ANR-15-IDEX-02 GlycoAlps).

²Author for contact: eric.marechal@cea.fr.

³Senior author.

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

J.L. performed most of the experiments; A.J. provided technical assistance for phenotypic analyses; C.V., C.O., and T.D. performed isoprostanooid analyses; J.L. and J.J. performed glycerolipidome analyses; J.-M.G., G.R., and J.V. contributed to isoprostanooid syntheses and analyses; C.V., J.J., and T.D. provided expertise in the analyses of all results; E.M. conceived the project; all the authors contributed to the writing of the article.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.18.00925

Some of these general responses are physiologically or metabolically linked, explaining why they are commonly encountered. In particular, photosynthesis impairment is marked by an imbalance between the absorption of light energy and the capacity to use it, leading to the generation of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and derivatives, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^{\bullet} ; Mullineaux et al., 2018). Before oxidative damage to PSII becomes significant, excess excitation energy usually is dissipated safely by antioxidant compounds like carotenoids or by processes acting as electron sinks. One of the energy dissipation processes involves the reduction of oxygen to $O_2^{\bullet-}$ via the Mehler reaction in the water-water cycle and gives rise to H_2O_2 by the action of superoxide dismutases (two genes in the diatom *P. tricornerutum*, Phatr3_J12583 and Phatr3_J42832; Curien et al., 2016; Mullineaux et al., 2018). Whereas water-water cycle activity is low in angiosperms, it accounts for up to 49% of total electron flux in diatoms (Warring et al., 2014). ROS chemistry is complex, and species can arise from different parallel routes, such as production of the free radical OH^{\bullet} from H_2O_2 either by interaction with $O_2^{\bullet-}$ via the Heiber-Weiss reaction or by interaction with metal ions via the Fenton reaction (Longini et al., 2017). The free radical $O_2^{\bullet-}$ can be produced not only by chloroplasts but also through mitochondrial electron transfer chain leakage directly to oxygen or by some endomembrane NADPH oxidases. Eventually, H_2O_2 can be generated by a variety of peroxisomal enzymes (Milne et al., 2011; Mullineaux et al., 2018).

The free radical OH^{\bullet} can trigger lipid peroxidation by hydrogen abstraction from polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and the addition of molecular oxygen to form a peroxy radical (Milne et al., 2011; Longini et al., 2017). The produced intermediates can undergo a nonenzymatic series of cyclization, addition of a second molecular oxygen, and reduction to form isoprostanoids (Galano et al., 2017), which are more stable than other peroxidation products, such as aldehydes or peroxy radicals (Longini et al., 2017).

Therefore, an important interplay between ROS-dependent signaling and glycerolipid status is expected. Glycerolipids consist of a glycerol backbone, esterified at positions *sn*-1 and *sn*-2 to fatty acids (FAs) of various carbon chain lengths and desaturation levels and harboring a polar head or a third FA at position *sn*-3. Glycerolipid classes include (1) phosphoglycerolipids usually present in endoplasmic reticulum and endomembranes, such as phosphatidylcholine (PC); (2) betaine lipids, such as diacylglycerol-hydroxymethyl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanine (DGTA); and (3) plastid glycolipids, such monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) or digalactosyldiacylglycerol (DGDG). When the polar head is substituted by an FA, (4) triacylglycerols (TAGs) are produced and accumulate in lipid droplets. Each of these classes is characterized by a profile of FAs, ranging from medium-chain saturated FAs (e.g. palmitic acid with 16 carbons and no double bonds [16:0]) to very-long-chain (VLC) PUFAs

(e.g. eicosapentaenoic acids, with 20 carbons and five double bonds [20:5]; Lupette and Maréchal, 2018). Stress-induced remodeling involves changes in the proportions of glycerolipid classes and, within a class, a tuning of the relative proportions of FAs. Nonstressed diatoms have high levels of VLC-PUFAs, whereas stressed cells accumulate TAG, usually with higher proportions of saturated and monounsaturated FAs (Abida et al., 2015; Dolch et al., 2017; Conte et al., 2018).

When *P. tricornerutum* is subjected to acute treatment with 150 μ M H_2O_2 , changes occur in the proportions of the oxidized forms of FAs, or oxylipins (Collins et al., 2016). However, this analysis did not allow the determination of the precise oxylipin molecular structures for each mass spectrometry peak assigned (Collins et al., 2016). Interestingly, a recent screen for small chemicals triggering TAG accumulation in *P. tricornerutum* identified compounds known to interfere with specific oxylipins in animal cells; they included misoprostol, a phosphatidylglycerol (PG) E1 analog, and azapropazone and meloxicam, two prostanoid-signaling modulators acting as potent PG-endoperoxide synthase inhibitors (Conte et al., 2018). This suggests that oxylipins containing a prostane ring (e.g. prostaglandins D-F) or at least a cyclopentane cycle (e.g. jasmonic acids) might be derived from PUFA peroxides, downstream of H_2O_2 treatment, and be associated with lipid remodeling.

Cyclopentane-containing oxylipins are produced via two major routes: enzymatic synthesis and non-enzymatic chemical synthesis (Supplemental Fig. S1). Concerning the first route, in the genome of *P. tricornerutum*, we could not detect any homolog of the enzymes classically involved in cyclopentane-oxylipin metabolism in animals (Funk, 2001) or plants (Blée, 1998, 2002; Feussner and Wasternack, 2002; Andreou and Feussner, 2009). Neither could we detect any homolog of enzymes involved in the synthesis of thromboxane (Funk, 2001), which has an ether-containing ring in place of a cyclopentane, or enzymes involved in the synthesis of noncyclic oxylipins in plants (Feussner and Wasternack, 2002). *P. tricornerutum*, therefore, lacks the enzymatic equipment to produce cyclopentane-oxylipin and differs from other diatom species, such as *Skeletonema marinoi*, in which enzymatic pathways have been described (Gerecht et al., 2011; Gallina et al., 2016; Di Dato et al., 2017). Therefore, the presence of a high basal level of oxidized FAs (5%–7%) reported in the lipidome of *P. tricornerutum* (Collins et al., 2016), with apparently a high structural but unresolved diversity, is puzzling.

The nonenzymatic formation of cyclopentane-oxylipins, isomers of prostanoids, also called isoprostanoids (Morrow et al., 1990), requires the presence of free radicals such as OH^{\bullet} (Mallick and Mohn, 2000; Roy et al., 2017) and the presence of at least three double bonds in the PUFA. PUFA peroxidation occurs in three steps: initiation by the attack of a radical species, propagation, and termination with the intervention of antioxidants (Montuschi et al., 2004). Depending

on the PUFA precursors, different groups of PG-like compounds (i.e. isoprostanes) are generated: phyto-prostanes (PhytoPs) from the radical peroxidation of α -linolenic acid (18:3 ω 3; Parchmann and Mueller, 1998); F_{2t}-isoprostanes (F_{2t}-IsoPs) and F_{3t}-isoprostanes (F_{3t}-IsoPs) from arachidonic acid (20:4 ω 6) and eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3), respectively (Morrow et al., 1990; Guy et al., 2014); and F_{4t}-neuroprostanes (F_{4t}-NeuroPs) from docosahexaenoic acid (22:6 ω 3; Nourooz-Zadeh et al., 1998; Roberts et al., 1998; Fig. 1).

In a previously reported mass spectrometry-based profiling of oxidized lipids (Collins et al., 2016), H₂O₂ treatment did not significantly increase the overall proportion of oxidized acyl moieties, but a selective modulation of some peaks was observed and was consistent with a possible modulation of PUFA oxidation, as described in numerous cell models in response to H₂O₂ in both plants (Buseman et al., 2006; Andreou et al., 2009; Vu et al., 2012) and animals (Janssen, 2001; Wenk, 2010; Strassburg et al., 2012; Galano et al., 2017; Roy et al., 2017). Therefore, we sought to determine whether isoprostanooids could be synthesized via a nonenzymatic pathway in *P. tricornutum*, whether this synthesis could be modulated by H₂O₂, and eventually whether this class of oxylipins might have a role in stress responses.

RESULTS AND DISCUSSION

P. tricornutum Lacks Genes Coding for Enzymes Synthesizing Cyclopentane-Oxylipins

We sought to determine whether any homologs of genes coding for enzymes classically involved in the production of cyclopentane-oxylipins could be detected in the genome of *P. tricornutum*. We used, as templates, sequences from the animal kingdom (Funk, 2001) that belong to lipoxygenases (Uniprot identifier P09917), PG-endoperoxide synthases or COX2 (P35354), prostacyclin synthases (Q16647), PG-H2 D-isomerases (P41222), prostamide/PG F synthases (Q8TBF2), and PG E synthases (O14684), and sequences from the plant kingdom (Blée, 1998, 2002; Feussner and Wasternack, 2002; Andreou and Feussner, 2009) that belong to plastidial lipoxygenases (TAIR identifier AT3G45140), allene oxide synthases (AT5G42650), and allene oxide cyclases (AT3G25770). Based on BLAST searches (Altschul et al., 1990) using the Blosom62 similarity matrix and an e-value threshold of 0.1, no homologous sequence could be retrieved in the complete genomic sequences available via the Ensembl portal (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum). We could not detect any homolog of enzymes involved in the synthesis of thromboxane (e.g. Uniprot identifier P24557; Funk, 2001) or of enzymes involved in the synthesis of noncyclic oxylipins in plants (e.g. B3LF83 and Q9FPM6; Feussner and Wasternack, 2002). Therefore, *P. tricornutum* lacks the enzymatic equipment

to produce cyclopentane-oxylipin and differs from other diatom species, such as *S. marinoi*, in which cyclopentane-oxylipin enzymatic pathways have been described (Gerecht et al., 2011; Gallina et al., 2016; Di Dato et al., 2017).

Detection of Isoprostanooids in *P. tricornutum* and Their Modulation upon Treatment with H₂O₂

We analyzed Pt1 (*P. tricornutum* CCMP632/CCAP 1055/1) wild-type cells incubated in the presence of increasing concentrations of H₂O₂ (0, 0.25, and 0.75 mM; Fig. 2). The total FA profile in membrane and storage glycerolipids showed moderate variations following 48 h of treatment with H₂O₂ (Fig. 2A). Consistent with past analyses (Abida et al., 2015; Popko et al., 2016), our study showed that *P. tricornutum* contains PUFA precursors for nonenzymatic oxylipins, marked by very low proportions of α -linolenic acid (18:3; less than 2% of total FAs; up to ~400 pmol per 1 million cells), ω 6-arachidonic acid and ω 3-eicosatetraenoic acid (20:4; less than 1%; less than 100 pmol per 1 million cells), and docosahexaenoic acid (22:6; less than 1%; less than 100 pmol per 1 million cells), and a very high content of eicosapentaenoic acid (20:5; 32%–35%; up to 10 ng per 1 million cells). After the H₂O₂ treatment, the only significant changes observed were a decrease in 16:3 and 20:5, two FAs found in galactolipids, indicating chloroplast impairment and, therefore, suggesting the amplification of ROS production following the impairment of photosynthetic capacity.

In line with previous studies (Burch and Franz, 2016), increasing doses of H₂O₂ affected *P. tricornutum* growth (Supplemental Fig. S2A) and triggered stress marked by the impairment of PSII, whose efficiency was evaluated by measuring the F_v/F_m ratio (Supplemental Fig. S2B). We observed an increased level of staining with Nile Red (Cooksey et al., 1987), a fluorescent marker of neutral lipids, only after treatment with 0.75 mM H₂O₂ (Supplemental Fig. S2C). This occurred with a significant increase in the number and size (radius = 0.423 μ m, n = 71) of lipid droplets observed in *P. tricornutum* cells by epifluorescence imaging (Supplemental Fig. S2, C–E). The strong impact on chloroplasts suggests increased ROS production as a combined result of the external addition of H₂O₂ and the production of O₂^{•-}, H₂O₂, and OH[•] following organellar dysfunction.

We evaluated the presence of isoprostanooids in the same samples by using a sensitive mass spectrometry method developed recently to analyze 24 macroalgal species (Barbosa et al., 2015; Vigor et al., 2018). We sought to determine the presence of fragmentation ion products from deprotonated molecules of PhytoP, IsoP, and NeuroP in multiple reaction monitoring mode, and their detection relied on the search for previously known structures (targeted lipidomic approach). Concentrations were obtained based on calibration curves calculated using internal standards. We could detect peaks for isoprostanooids generated from all PUFAs present in *P. tricornutum*, such as PhytoP from C18:3

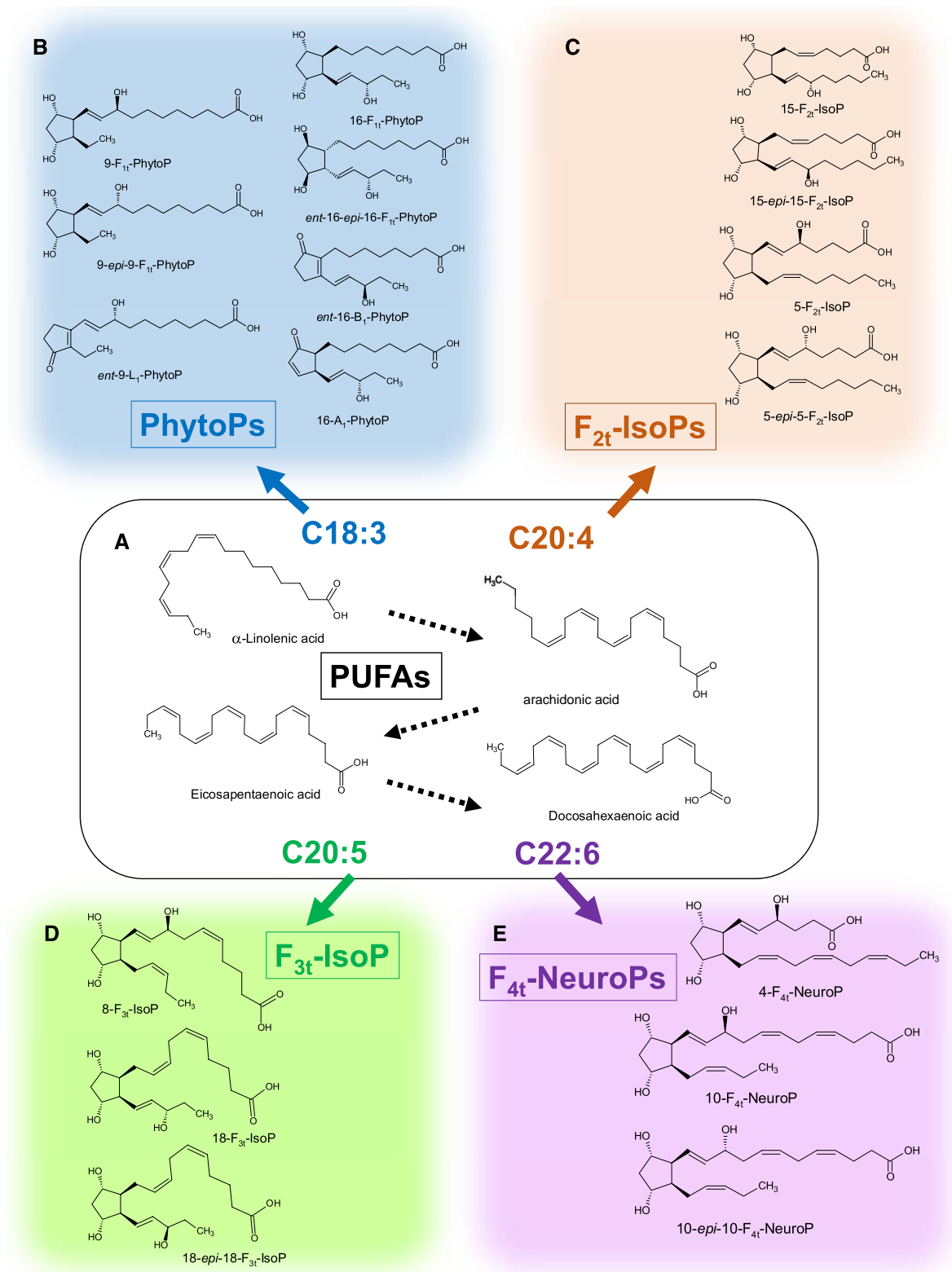


Figure 1. Chemical structures of isoprostanoids, nonenzymatic oxylipins generated from the free radical peroxidation of PUFAs. Free radicals such as OH^{*} trigger the peroxidation of lipids, by hydrogen abstraction from PUFAs, and the addition of molecular oxygen to form a peroxy radical. The intermediates produced undergo a nonenzymatic series of cyclization, addition of a second molecular oxygen, and reduction to form prostanoids. A, Main PUFAs. B, PhytoPs from α -linolenic acid. C, F_{2t}-IsoPs from arachidonic acid. D, F_{3t}-IsoPs from eicosapentaenoic acid. E, F_{4t}-NeuroPs from docosahexaenoic acid. A large number of isoprostanoids can be formed from each PUFA substrate. The scheme shows the main structures analyzed in this study.

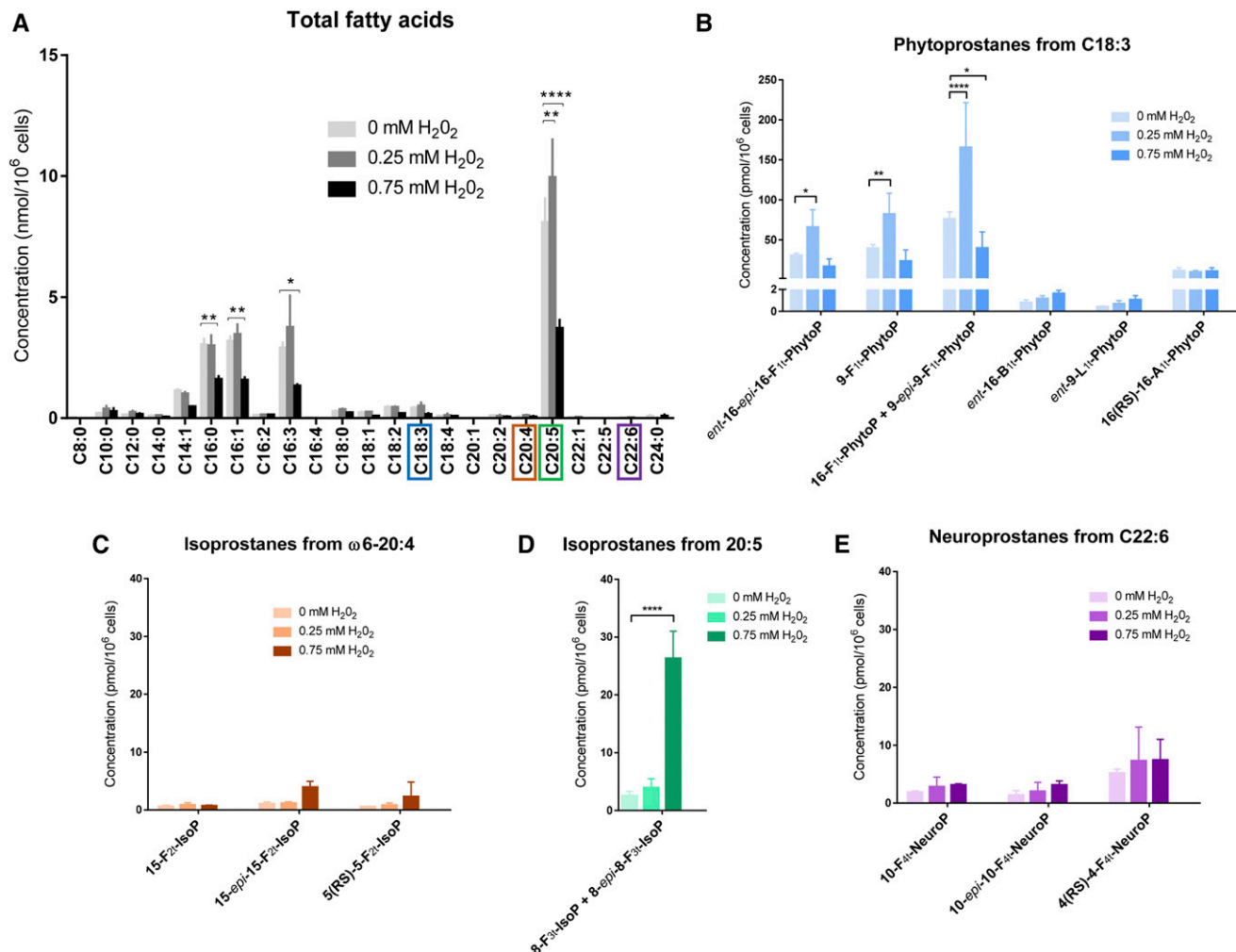


Figure 2. Characterization of PhytoPs, NeuroPs, and IsoPs in *P. tricornutum* cells. The incubation was performed in a volume of 50 mL, inoculated at 5×10^6 cells mL⁻¹. Lipids were extracted and analyzed after 48 h of incubation in the presence of H₂O₂ at the indicated doses. A, Total FA profile for increasing doses of H₂O₂. B, Concentration of phytoprostanes from α -linolenic acid normalized with the cell concentration. C18:3 and corresponding phytoprostanes are shown in blue. C and D, Concentrations of F_{2t}-IsoPs and F_{3t}-IsoPs from eicosatetraenoic and eicosapentaenoic acids. C20:4 and C20:5 and corresponding isoprostanes are shown in brown and green, respectively. E, Concentration of F_{4t}-NeuroPs from docosahexaenoic acid. C22:6 and corresponding neuroprostan are shown in purple. Values correspond to three biological replicates. Statistically relevant responses (two-way ANOVA with Dunnett's posthoc test) are indicated by asterisks: *, $P < 5 \times 10^{-2}$; **, $P < 5 \times 10^{-3}$; and ****, $P < 10^{-4}$.

(ent-16-epi-16-F₁₁-PhytoP, 9-F₁₁-PhytoP, ent-16-B₁₁-PhytoP, ent-9-L₁₁-PhytoP, and peaks corresponding to either 16-F₁₁-PhytoP or 9-epi-9-F₁₁-PhytoP; Fig. 2B), IsoP from C20:4 (15-F_{2t}-IsoP, 15-epi-15-F_{2t}-IsoP, and 5(R/S)-5-F_{2t}-IsoP; Fig. 2C), IsoP from C20:5 (peaks corresponding to either 8-F_{3t}-IsoP or 8-epi-8-F_{3t}-IsoP; Fig. 2D), and NeuroP from C22:6 (4(RS)-4-F_{4t}-NeuroP, 10F_{4t}-NeuroP, and 10-epi-10-F_{4t}-NeuroP; Fig. 2E).

Based on these targeted analyses, although C18:3 represents a minor FA substrate, PhytoPs constitute the main family of nonenzymatic oxylipins in *P. tricornutum* (up to 300 pmol of total PhytoP per 1 million cells), in the same concentration range as that of nonoxidized C18:3 (up to 400 pmol per 1 million cells). The F₁₁-PhytoP series is the most abundant, as recorded previously in

C18:3-rich plant species (Collado-González et al., 2015) and in all studies on Chlorophyta, Phaeophyta, and Rhodophyta macroalgae so far (Barbosa et al., 2015). In plants, F₁₁-PhytoPs are in the same concentration range as phytooxylipins of the enzymatic pathway, such as 12-oxo-phytodienoic acid or jasmonic acid (Parchmann and Mueller, 1998; Imbusch and Mueller, 2000; Thoma et al., 2003). The low concentrations of ent-16-B₁₁-PhytoP as well as the very low level of 16(RS)-16-A₁₁-PhytoPs indicate that radical peroxidation of α -linolenic acid preferentially activates the pathway of F₁₁-PhytoP. Interestingly, we did not detect any D₁- and J₁-PhytoP in the cultures of *P. tricornutum* cells, two series of phytoprostanes commonly found in higher plants (Jahn et al., 2010; Collado-González et al., 2015).

A significant increase in the F_{1t} -PhytoP concentration occurred after treatment with 0.25 mM H_2O_2 ($P = 0.0163$ for *ent*-16-*epi*-16- F_{1t} -PhytoP, $P = 0.0012$ for 9- F_{1t} -PhytoP, and $P < 0.0001$ for compounds with fragmentation peaks corresponding to those of 16- F_{1t} -PhytoP and/or 9-*epi*-9- F_{1t} -PhytoP), whereas a wild-type concentration level was observed after a nearly lethal treatment with 0.75 mM H_2O_2 . Concentrations of A_{1t} -, B_{1t} -, and L_{1t} -PhytoPs remained very low and appeared unaffected by the treatment (less than 1 ng per 1 million cells; Fig. 2B). H_2O_2 is known to further oxidize isoprostanoids into toxic aldehydes (Long et al., 2008). We do not exclude the possibility that PhytoPs might be further oxidized under very strong oxidative stress conditions.

In *P. tricornutum*, only a minor portion of C20:4 corresponds to ω 6-arachidonic acid (ω 6-C20:4), the main being eicosatetraenoic acid (ω 3-C20:4; Arao et al., 1987, 1994; Arao and Yamada, 1994; Abida et al., 2015; Dolch and Maréchal, 2015). Nevertheless, three isoprostanoids of the F_{2t} series (15- F_{2t} -IsoP, 15-*epi*-15- F_{2t} -IsoP, and 5(RS)-5- F_{2t} -IsoP) derived from ω 6-C20:4 could be detected (Fig. 2C). These F_{2t} -IsoPs remained in very low concentrations and did not accumulate in high levels upon H_2O_2 treatment.

Surprisingly, although C20:5 is the most abundant FA in unstressed *P. tricornutum* cells (~300 ng per 1 million cells; Fig. 2A), due to its very high level in some classes of membrane lipids (Abida et al., 2015; Dolch and Maréchal, 2015), only a low concentration of 8(RS)-8- F_{3t} -IsoP could be detected (~2–30 pmol per 1 million cells; Fig. 2D). As observed for IsoPs derived from C20:4, the concentration of 8(RS)-8- F_{3t} -IsoP increased as a function of H_2O_2 ($P < 0.0001$).

Although C22:6 is a very minor FA in *P. tricornutum*, we detected three neuroprostanes, 10- F_{4t} -NeuroP, 10-*epi*-10- F_{4t} -NeuroP, and 4(RS)-4- F_{4t} -NeuroP, in the same concentration range as nonoxidized C22:6 (Fig. 2E). No significant difference was observed in NeuroP concentrations after treatment with higher doses of H_2O_2 .

PC and/or DGTA Are Potential Precursors for Nonenzymatic Production of Isoprostanoids

By contrast with enzymatically produced prostanooids, isoprostanoids are generated on esterified lipids prior to their release as free oxidized lipids by phospholipases A_2 (Morrow et al., 1992; Ibrahim et al., 2011a). Phytoprostanoids of the F1 series being the most abundant in *P. tricornutum*, we sought to determine which lipid class could represent a likely source of the corresponding C18:3 substrate, both in unstressed conditions and upon treatment with H_2O_2 (Fig. 3).

The complete profile of glycerolipids showed a significant decrease in MGDG and an increase in TAG at 0.75 mM H_2O_2 (Fig. 3A). In striking contrast to other stress conditions, which trigger the accumulation of TAGs enriched in C16:0 and C16:1 (Abida et al., 2015), treatment with H_2O_2 triggered the accumulation of TAG molecular species enriched in PUFAs and VLC-PUFAs (Fig. 3B). This indicates a synthesis from recycled

C16:2-, C16:3-, and C20:5-rich membrane lipids rather than de novo synthesis from C16:0- and C16:1-rich diacyl precursors. Such diversion of PUFAs to TAG has been reported previously in *Drosophila melanogaster* stem cells exposed to oxidative damage, including H_2O_2 treatment, and interpreted to be a mechanism to protect PUFAs from excessive and harmful peroxidation (Bailey et al., 2015). The presence of C16:3 in TAG reflects the incorporation of acyl moieties derived from chloroplast lipids that contain this FA in high proportions, possibly from MGDG and, to a lower extent, DGDG (Fig. 3C). An MGDG-to-TAG conversion is supported further by the decrease in C16:3- and C20:5-rich MGDG molecular species. The concentration of another chloroplast lipid, SQDG, also declines (Fig. 3C), with little modifications in its molecular species. By contrast, the PG level decreases significantly at high H_2O_2 concentration, mainly due to a decrease in C16:0/C16:1 and C16:1/C16:1 molecular species, possibly reflecting the impact on one of the PG pools in *P. tricornutum* cells (i.e. in the chloroplast, the mitochondrion, or the endoplasmic reticulum). Since no subcellular lipidome has been identified to date for any of these compartments in diatoms, the identity of the pool of PG affected by H_2O_2 could not be characterized further.

It is interesting that the global DGDG level is unaffected by H_2O_2 treatment (Fig. 3A). Nevertheless, the FA profile of DGDG is modified, showing an increase in the level of molecular species such as C20:5/C16:0, C20:5/C16:2, and C20:5/C16:3, some of which could be derived from MGDG. In addition to an MGDG-to-TAG conversion, the MGDG-to-DGDG pathway likely is activated.

Galactolipids contain high levels of C20:5 (Fig. 3C). The ratio of F_{3t} -IsoP/unoxidized C20:5 being lower than 1% to 10%, it is possible that galactolipids are not an important platform for F_{3t} -IsoP production. Such a low proportion of isoprostanoids has been reported earlier in a comprehensive analysis of oxylipins esterified to plant galactolipids (Ibrahim et al., 2011b).

Only PC and DGTA contained sufficient amounts of C18:3 to justify a role as a substrate glycerolipid for the production of PhytoP (taking into account that 2 nmol of FA corresponds to 1 nmol of glycerolipid; Fig. 3C). In addition, these two glycerolipid classes also contain C20:4, C20:5, and C22:6 acyl groups, which could be involved in the production of other IsoPs and NeuroPs detected in *P. tricornutum*. Therefore, one or both of these lipids might be the platform for the nonenzymatic production of prostanooids in *P. tricornutum*. Given the fact that the ratio of total PhytoP to nonoxidized C18:3 is close to 1 and that of NeuroP to nonoxidized C22:6 is higher than 1, one would expect the production of isoprostanoids from PC and DGTA to be intense and to have a biological function.

Dose-Response Effect of Isoprostanoids on *P. tricornutum*

Isoprostanoids have been considered indicators of oxidative stress for decades. The study of their biological

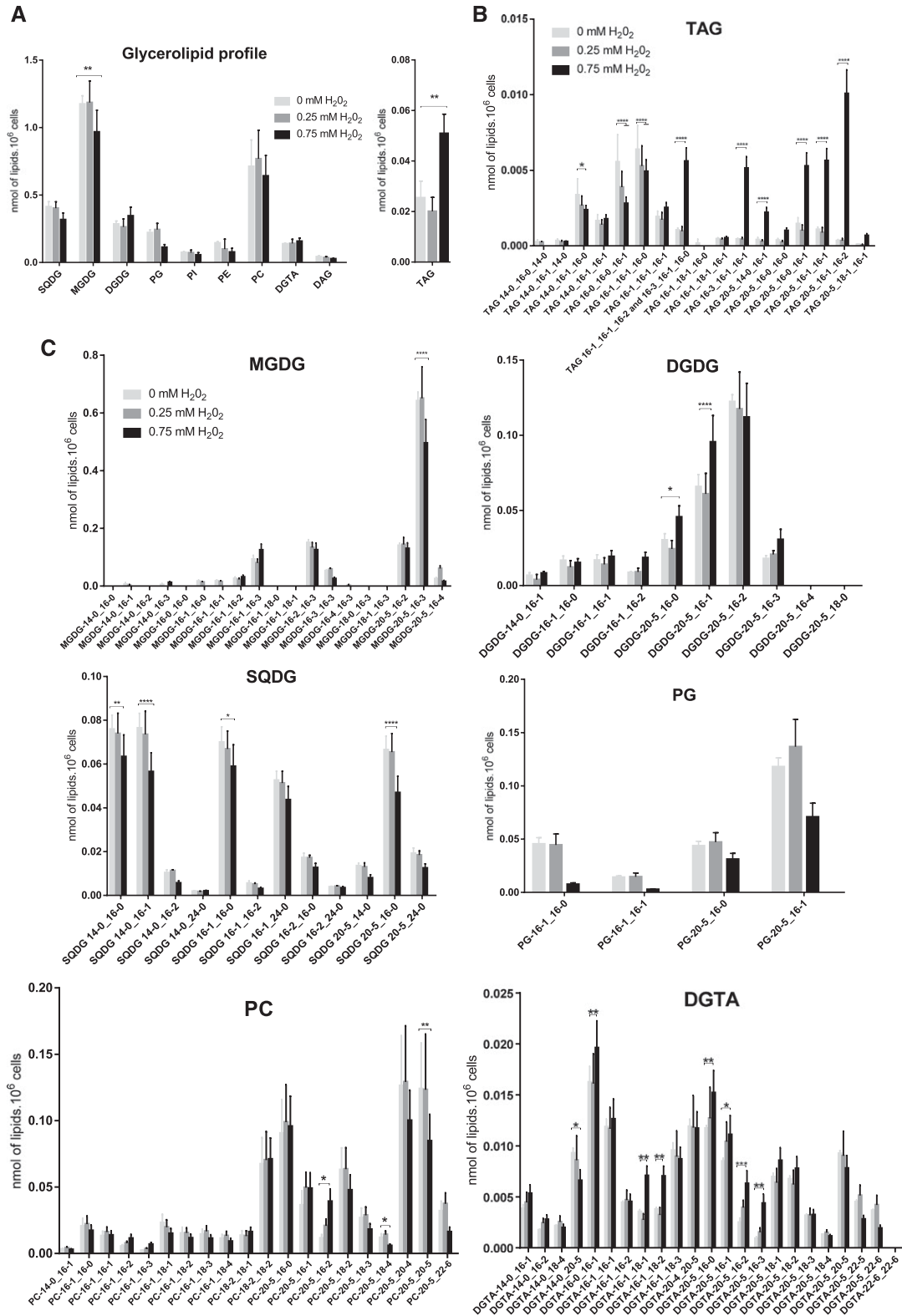


Figure 3. Glycerolipid profile following treatment with H₂O₂. *P. tricornutum* cells were cultivated in Enriched Seawater, Artificial Water medium using 10 times enriched nitrogen and phosphate sources (ESAW 10N10P) until a cell density of 5 × 10⁶ cells mL⁻¹ was reached. Cells then were incubated for 48 h in the presence or absence of H₂O₂, as indicated. Lipids were extracted and analyzed as described in “Materials and Methods.” A, Glycerolipid profile following treatments with increasing doses of H₂O₂. Glycerolipid concentrations are expressed in nmol per 1 million cells. B, Fatty acid profile of TAG. C, Fatty acid

action is still in its infancy, particularly in photosynthetic organisms. Evidence on specific functions that could be attributed to isoprostanoids was sought initially in animal models. Thus, IsoPs were shown to act as agonists or antagonists binding to prostanoid receptors, among them the thromboxane receptor, PG F₂ receptor, PG E₂ subtype 3 receptor, and PG D₂ subtype 2 receptor (Janssen, 2001; Milne et al., 2011; Galano et al., 2017). Recently, drugs acting on prostanoid receptors were identified in a pharmacological screen, which screened for the accumulation of lipid droplets in *P. tricornutum* cells (Conte et al., 2018), suggesting that prostanoid/isoprostanoid-sensing systems also could be present and control TAG biosynthesis in diatoms.

Therefore, we investigated if some of the compounds identified here could have a similar impact on *P. tricornutum* phenotype. To that purpose, we analyzed *P. tricornutum* cell culture incubated in the presence of nine synthetic isoprostanoids added at concentrations in the micromolar range (i.e. at 0, 5, 25, and 50 μM ; Fig. 4). For PhytoP, we tested the B₁ and L₁ series and their diastereoisomers (Fig. 4, A–D), which are minor compounds in the *P. tricornutum* cultures (Fig. 2B). We analyzed the effects of four F_{3t}-IsoPs, which could be derived from the peroxidation of C20:5 (Fig. 4, E–H). Eventually, we tested the NeuroP detected in *P. tricornutum* cells (i.e. 4(RS)-4-F_{4t}-NeuroP, derived from the peroxidation of C22:6; Figs. 2D and 4I). We observed similar effects for all isoprostanoids, most strikingly a 10% to 20% decrease in the cell concentration at the lowest doses (5 μM), with the exception of 9-L₁-PhytoPs, with growth being affected at 25 μM (Fig. 4). An impact on cell division has been reported previously in *Arabidopsis thaliana*, in which a treatment with 25 μM A₁-PhytoP reduced the growth of roots by almost half (Mueller et al., 2008). This impact on growth also was noticed in mutant plants that lack tocopherols, which results in a lack of control of nonenzymatic lipid peroxidation during early development (Sattler et al., 2006).

Staining with Nile Red showed a 10% to 30% increase in the levels of the four PhytoPs at 50 μM at 48 h after incubation; this supports the induction of neutral lipid accumulation (Fig. 4, A–D). An increase in Nile Red staining also was observed at low doses of IsoP and NeuroP (5 μM), and the levels returned to the control level at higher concentrations (50 μM ; Fig. 4, E–I). The activity of PSII as assessed by the F_v/F_m ratio was stable in cultures incubated with any of the tested isoprostanoids regardless of the concentration (Fig. 4).

Isoprostanoids, therefore, seem to trigger some of the effects observed after H₂O₂ treatment, in particular, a decrease in growth and an increase in the levels of neutral lipids; however, no deleterious impact of H₂O₂ on photosynthesis was observed. Assuming

an average cell volume of 65 μm^3 (Li et al., 2012) for *P. tricornutum*, the consolidated cell volume in 1×10^6 cells can be calculated to be 65 μL . The bioactive concentrations of isoprostanoids (i.e. triggering an effect on *P. tricornutum*) ranged from 10 to 300 pmol per 1 million cells (Fig. 2; i.e. in the 0.15 to 4 μM range). Are these concentrations consistent with a role in cell-to-cell communication (i.e. as molecules known as infochemicals) or a role as intracellular mediators? In the oceanic environment, the expected concentrations for a possible role as a cell-to-cell mediator is in the low picomole to nanomole range, which is far below the concentrations found in this study to speculate on isoprostanoids serving as infochemicals. Rather, the dose-response analyses we performed, which showed a biological effect on *P. tricornutum* cells (Fig. 4), represent realistic conditions for intracellular mediators. Thus, we propose a model for the induction of isoprostanoids in *P. tricornutum* and their activity (Fig. 5). First, this model considers environmental conditions that induce stress in diatoms, leading directly or indirectly to the dysfunction of organelles like the chloroplast, the mitochondrion, or the peroxisome or triggering an oxidative burst, such as that occurring in some biotic interactions in plants. Such series of cellular effects occur in the majority of abiotic and biotic stresses. ROS are then produced, including O₂[•], H₂O₂, and, following the different reactions described above, OH[•]. If protective systems fail to control the oxidative stress, lipid peroxidation can occur, essentially at the level of PC and/or DGTA, containing the sufficient amounts of FA substrates to allow the generation of PhytoP, IsoP, and NeuroP. These isoprostanoids inhibit growth and induce the production of TAG via an unknown process. It is possible that isoprostanoids regulate the MGDG-to-TAG conversion and, thus, contribute to this PUFA protection mechanism. Isoprostanoids apparently have no effect on photosystems, indicating that another mechanism is involved to account for the susceptibility of PSII to H₂O₂. Other biological actions might be controlled by isoprostanoid signaling, possibly at the transcriptional level. In plants, PhytoPs were shown to regulate gene expression (Thoma et al., 2003; Loeffler et al., 2005; Mueller et al., 2008), up-regulating genes related to detoxification, stress response, and pathways not associated with chloroplasts and photosynthesis.

CONCLUSION

The production of oxidized FAs in *P. tricornutum* has remained unexplained for decades. No gene equipment seems present to allow the production of canonical prostanoids, such as jasmonic acids or prostaglandins

Figure 3. (Continued.)

profiles of membrane glycerolipids following treatment with increasing doses of H₂O₂. Data correspond to biological triplicates \pm sd. SQDG, Sulfoquinovosyldiacylglycerol. Values correspond to three biological replicates. Statistically relevant responses (two-way ANOVA with Dunnett's posthoc test) are indicated by asterisks: *, $P < 5 \times 10^{-2}$; **, $P < 5 \times 10^{-3}$; and ****, $P < 10^{-4}$.

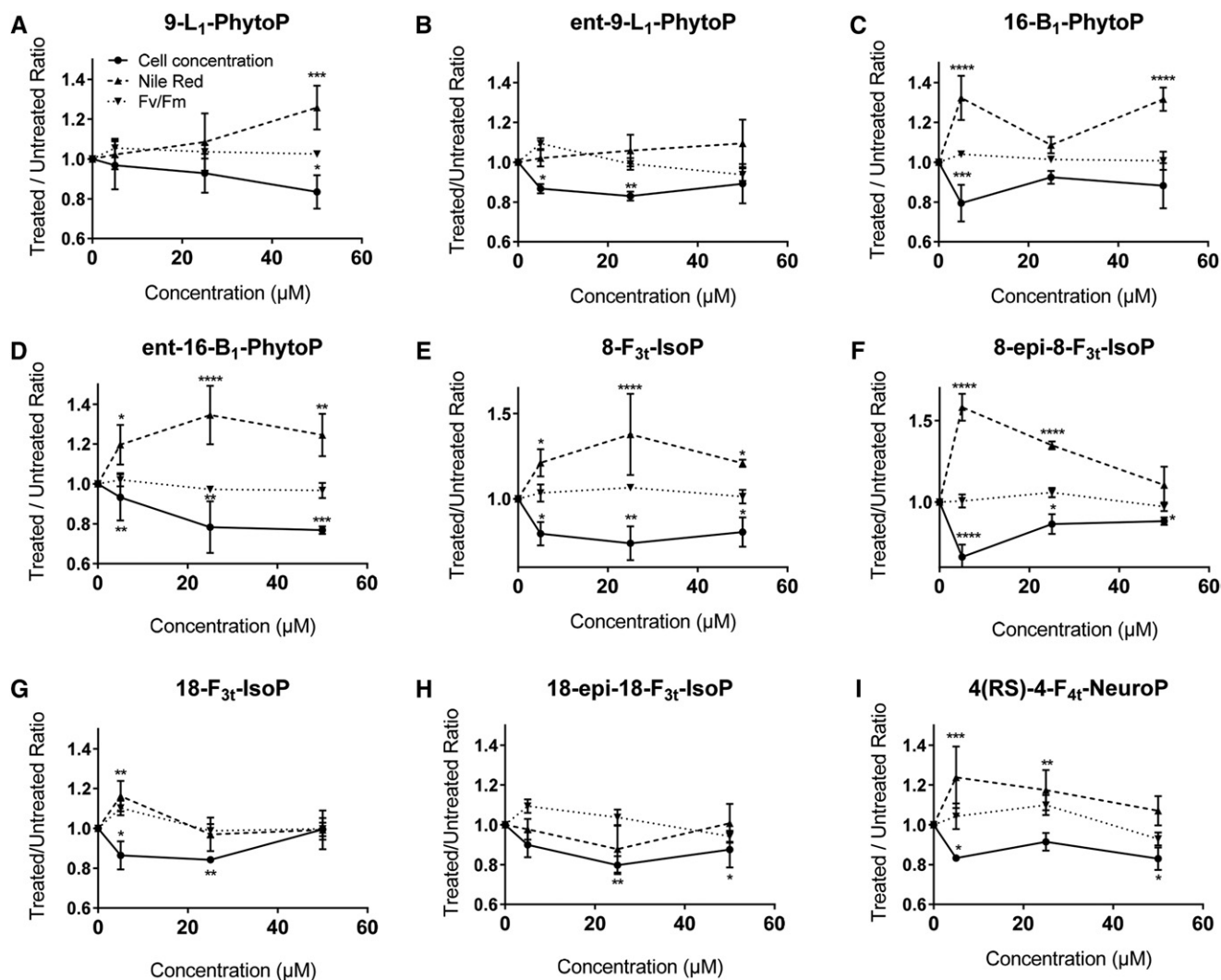


Figure 4. Effects of PhytoPs, IsoPs, and NeuroPs on *P. tricornutum* cells. Values correspond to three biological replicates. A 48-h incubation was performed in a volume of 2 mL, on 24-well plates, inoculated at 10^6 cells mL⁻¹, with immediate addition of chemicals. Three concentrations of each isoprostanoid were tested (5, 25, and 50 μ M). Incubations were performed with 9-L₁-PhytoP (A), ent-9-L₁-PhytoP (B), 16-B₁-PhytoP (C), ent-16-B₁-PhytoP (D), 8-F_{3t}-IsoP (E), 8-epi-8-F_{3t}-IsoP (F), ¹⁸F_{3t}-IsoP (G), 18-epi-¹⁸F_{3t}-IsoP (H), and 4(RS)-4-F_{4t}-NeuroP (I). Cell growth (circles), Nile Red accumulation (squares), and the PSII quantum efficiency F_v/F_m (triangles) were measured after 48 h of treatment as described in "Materials and Methods." Results were normalized to untreated controls. Statistically relevant responses (two-way ANOVA) are indicated by asterisks: *, $P < 5 \times 10^{-2}$; **, $P < 5 \times 10^{-3}$; ***, $P < 1.1 \times 10^{-3}$; and ****, $P < 1.1 \times 10^{-4}$.

and thromboxanes. This phenomenon is not specific to all diatoms, since other species, such as *S. marinoi*, have oxylipin biosynthetic pathways producing prostanoids (Gerecht et al., 2011; Gallina et al., 2016; Di Dato et al., 2017). A first line of investigation focused on the possible production of polyunsaturated aldehydes (PUAs). After wounding or exposure to nutrient stresses, diatom PUFAs were shown to be oxidized enzymatically into volatile PUAs, including 2E,4E-decadienal (Miralto et al., 1999). PUAs initially were considered potent interspecific and intraspecific signaling compounds, triggering programmed cell death (Casotti et al., 2005; Vardi et al., 2006) and possibly acting as infochemicals

in population size control. However, PUAs could not be detected in *P. tricornutum* lipidomic analyses (Collins et al., 2016); therefore, they might be present at extremely low levels. Effects of PUAs on *P. tricornutum* were detected in the high 20 μ M range, which seems above the concentration expected for a cell-to-cell mediation by multiple orders of magnitude, making PUAs unlikely infochemicals. The mode of action of PUAs via the activation of nitric oxide was reevaluated recently (Dolch et al., 2017). That study characterizes nonenzymatic cyclopentane-oxylipins in *P. tricornutum*, in high intracellular concentrations, which is consistent with their function as signaling compounds. Not

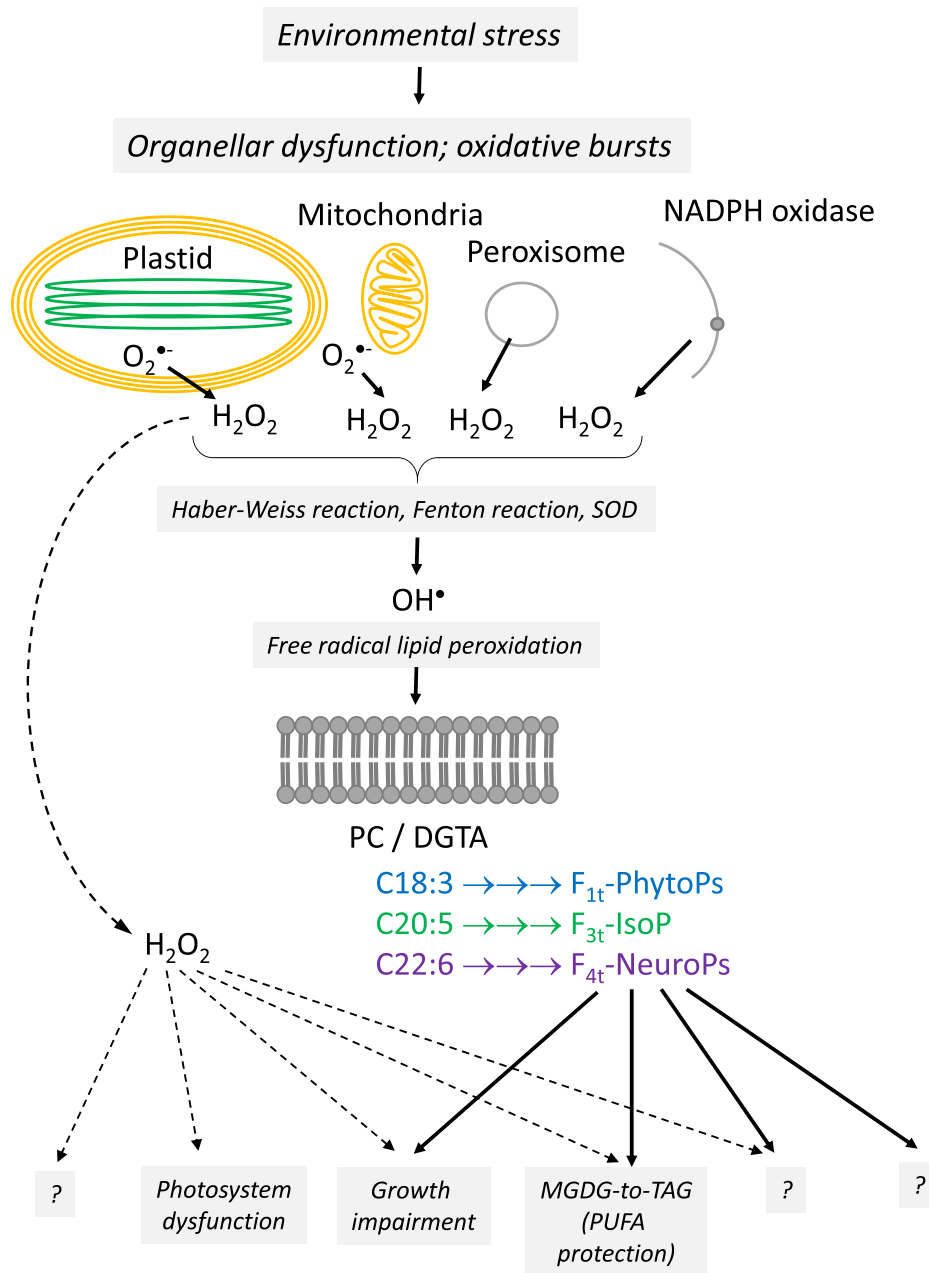


Figure 5. Model for nonenzymatic isoprostanoid production and a specific role in ROS-dependent signaling pathways in *P. tricornutum*.

all membrane lipids seem to be appropriate for their production, since only PC and DGTA have the most coherent FA profile with the molecular diversity of isoprostanoids produced. F_{1t}-PhytoP produced from C18:3 is the most abundant form. The production of NeuroP also can explain why a very low basal level of C22:6 is maintained in PC and DGTA, whereas other glycerolipids seem to contain only traces of this FA or to not contain any. We provide evidence that isoprostanoids are potential intracellular mediators, partly responsible for TAG accumulation triggered by oxidative stress.

The high content of PUFAs and VLC-PUFAs inside these lipid droplets suggests a role in the protection of FAs sensitive to oxidation. A similar mechanism might control the accumulation of small lipid droplets in *P. tricornutum* exposed to nitric oxide, as NO• is known to react with O₂•⁻ to form ONOO⁻ ions, which is involved in the nitrosylation and peroxidation of lipids (Janssen, 2001). Excessive oxidative conditions can lead to the conversion of isoprostanoids into toxic aldehydes (Long et al., 2008), as one of the entry points toward necrosis. Potential foci for future research include the exploration of environmental conditions

triggering isoprostanoid production in *P. tricornutum* and the identification of molecular and cell components involved in their control. Large-scale cultures treated with synthetic isoprostanoids should allow refined analyses of transcriptomic, proteomic, and lipidomic changes that will help characterize the components of the signaling pathways. Finally, microalgal oil is considered a promising resource for the development of biofuels and green chemistry; therefore, it is relevant to identify the molecular mechanisms driving the accumulation of unsaturated FA/monounsaturated FA inside TAGs in conditions such as nutrient stress and those involved in the protection of PUFAs inside TAGs under oxidative stress and the likely combination of both under numerous conditions.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The chemicals used in the composition of growth media and 30% (v/v) H₂O₂ were obtained from Sigma-Aldrich. Eight PhytoP standards (9-L₁-PhytoP, *ent*-9-L₁-PhytoP, *ent*-16-*epi*-16-F₁₁-PhytoP, 9F₁₁-PhytoP, 16F₁₁-PhytoP + 9-*epi*-9-F₁₁-PhytoP, 16(RS)-16-A₃₁-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and *ent*-16-B₁-PhytoP), three NeuroP standards (4(RS)-4-F₄₁-NeuroP, 10-F₄₁-NeuroP, and 10-*epi*-10-F₄₁-NeuroP), and eight IsoP standards (8-F₃₁-IsoP, 8-*epi*-8-F₃₁-IsoP, ¹⁸F₃₁-IsoP, 18-*epi*-¹⁸F₃₁-IsoP, 15-F₂₁-IsoP, 15-*epi*-15-F₂₁-IsoP, 5-F₂₁-IsoP, and 5-*epi*-5-F₂₁-IsoP) were chemically synthesized (Durand et al., 2004; El Fangour et al., 2005; Oger et al., 2010; Guy et al., 2014, 2015). The internal standard d₄-15-F₂₁-IsoP was acquired from Cayman Chemicals.

Cultivation of *Phaeodactylum tricornutum*

P. tricornutum (Pt1) Bohlin Strain 8.6 CCMP2561 (Culture Collection of Marine Phytoplankton, now known as NCMA: National Center for Marine Algae and Microbiota) was used in all experiments. Pt1 cells were maintained and grown in a volume of 50 mL in 100-mL flasks or in a volume of 2 mL on 24-well plates at 20°C in a modified ESAW medium (NaCl 362.7 mM, Na₂SO₄ 25 mM, KCl 8.03 mM, NaHCO₃ 2.067 mM, KBr 0.725 mM, H₃BO₃ 0.372 mM, NaF 0.0657 mM, MgCl₂ 47.18 mM, CaCl₂ 9.134 mM, SrCl₂ 0.082 mM, Na₂-glycerophosphate 21.8 μM, Na₂SiO₃ 105.6 μM, Na₂EDTA 14.86 μM, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 5.97 μM, FeCl₃ 0.592 μM, MnSO₄ 2.42 μM, ZnSO₄ 0.254 μM, CoSO₄ 0.0569 μM, Na₂MoO₄ 0.52 μM, H₃BO₃ 61.46 μM, Na₂SeO₃ 10 nM, biotin [vitamin H] 8.18 nM, cobalamin [vitamin B₁₂] 2.94 nM, and thiamine [vitamin B₁] 0.594 μM; Falciatore et al., 2000) using ESAW 10N10P, containing 5.49 mM NaNO₃ and 0.224 mM NaH₂PO₄; Abida et al., 2015). Cells were grown on a 12/12-h light (50 μE m⁻² s⁻¹)/dark cycle. Growth was evaluated by cell counting using a TECAN Infinite M1000Pro plate reader and determined following the equation $y = 1.834 \times 10^{-08} x + 0.03758$, where x = the A₇₃₀ and y = the number of cells (Conte et al., 2018).

Incubation of *P. tricornutum* with H₂O₂

From a stock solution of 9.79 M H₂O₂ (Sigma-Aldrich), a 0.5 M stock solution was prepared freshly and dissolved in ESAW 10N10P medium. A 50-mL volume of *P. tricornutum* was incubated at a cell density of 5 × 10⁶ cells mL⁻¹, in 100-mL flasks, with different concentrations of H₂O₂ (0, 0.25, and 0.75 mM) during 48 h. These H₂O₂ concentrations were defined empirically based on *P. tricornutum* growth. Incubations were performed in independent biological triplicates. Growth was quantified based on absorption at 730 nm using a TECAN Infinite M1000Pro plate reader and normalized with the untreated control (Conte et al., 2018).

Incubation of *P. tricornutum* with PhytoPs, NeuroPs, and IsoPs

A 2-mL volume of a *P. tricornutum* culture was inoculated at a cell density of 10⁶ cells mL⁻¹, on 24-well plates, and incubated with different concentrations

of isoprostanoids (0, 5, 25, and 50 μM) solubilized in methanol (final concentration, 1%) during 48 h. Growth was quantified based on absorption at 730 nm using a TECAN Infinite M1000Pro plate reader and normalized with the untreated control (Conte et al., 2018).

Chlorophyll Fluorescence and Photosynthetic Parameters

To determine photosynthesis parameters in cell cultures, room temperature fast chlorophyll fluorescence kinetics was measured using a Speedzen MX fluorescence imaging system (JBeamBio) with previously described settings (Johnson et al., 2009; Allorent et al., 2013). To this end, a 150-μL volume of *P. tricornutum* culture was transferred to a transparent 96-well plate and dark incubated for 15 to 30 min before measurements. Excitation was performed in the blue range ($\lambda = 450$ nm; F_0). F_0 is the steady-state fluorescence in dark-adapted cultures, and F_m is the maximal fluorescence after a saturating light pulse with green light (520 nm) of dark-adapted cultures. F_v is the difference between F_m and F_0 . With these parameters, the maximum efficiency of energy conversion of PSII can be calculated as F_v/F_m (Butler and Kitajima, 1975; Misra et al., 2012).

Imaging of TAG Accumulation in *P. tricornutum* Cells Based on Nile Red Staining

The accumulation of TAG droplets in lipid droplets in the cytosol was monitored using Nile Red (Sigma-Aldrich) fluorescent staining (excitation wavelength at 485 nm, emission at 525 nm) as described previously (Cooksey et al., 1987; Abida et al., 2015; Conte et al., 2018). In brief, cells were diluted and adjusted to a cell density that was linearly correlated with Nile Red fluorescence. Nile Red solution (40 μL of a 2.5 μg mL⁻¹ stock solution in dimethyl sulfoxide) was added to 160-μL cell suspensions. Nile Red fluorescence values were normalized to the cell concentration. Lipid droplets stained with Nile Red were then visualized using a Zeiss LSM800 confocal laser scanning microscope equipped with a Zeiss Plan-APO 63× numerical aperture, 1.46 oil-immersion objective and enlarged 4×. Nile Red fluorescence was monitored by excitation at 488 nm and a capture zone ranging from 579 to 641 nm. Chlorophyll autofluorescence was monitored by excitation at 488 nm and a capture zone ranging from 650 to 700 nm. Bright-field acquisition was performed in parallel. Acquired images were imported and analyzed with ImageJ 1.48v using the BIO-FORMATS plugins 5.7.2. Student's *t* test was performed to compare the means of lipid droplet dimensions (radius).

Glycerolipid Extraction and Profiling

Glycerolipids were extracted from freeze-dried *P. tricornutum* cells grown in 50 mL of ESAW medium. About 50 × 10⁶ to 100 × 10⁶ cells are required for a triplicate analysis. First, cells were harvested by centrifugation and immediately frozen in liquid nitrogen. Once freeze dried, the pellet was suspended in 4 mL of boiling ethanol for 5 min to prevent lipid degradation, and lipids were extracted as described previously (Simionato et al., 2013) by the addition of 2 mL of methanol and 8 mL of chloroform at room temperature. The mixture was then saturated with argon and stirred for 1 h at room temperature. After filtration through glass wool, cell debris was rinsed with 3 mL of chloroform:methanol (2:1, v/v), and 5 mL of 1% NaCl was then added to the filtrate to initiate phase separation. The chloroform phase was dried under argon before solubilizing the lipid extract in 1 mL of chloroform. Total glycerolipids were quantified from their FAs: in a 10-μL aliquot fraction, a known quantity of saturated 15-carbon FA (15:0) was added and all FAs were methanolyzed into methyl esters (FAMES) by a 1-h incubation in 3 mL of 2.5% H₂SO₄ in pure methanol at 100°C (Jouhet et al., 2003). The reaction was stopped by the addition of 3 mL of water, and 3 mL of hexane was added for phase separation. After 20 min of incubation, the hexane phase was transferred to a new tube. FAMES were extracted a second time via the addition, incubation, and extraction of another 3 mL of hexane. The combined collected hexane fractions (6 mL) were argon dried, and FAMES were suspended in 40 μL of hexane for analysis by gas chromatography coupled with flame ionization detection (Perkin-Elmer), using a BPX70 (SGE) column. FAMES were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma-Aldrich) and quantified by the surface peak method using 15:0 for calibration.

Extraction and quantification were performed with three biological replicates. Glycerolipids were then analyzed and quantified by HPLC-tandem mass spectrometry, with appropriate standard lipids (Jouhet et al., 2017). In brief, lipid extracts corresponding to 25 nmol of total FAs were dissolved in 100 μL of chloroform:methanol (2:1, v/v) containing 125 pmol of each internal

standard. The internal standards used were phosphatidylethanolamine 18:0-18:0 and diacylglycerol 18:0-22:6 from Avanti Polar Lipids and SQDG 16:0-18:0 extracted from spinach (*Spinacia oleracea*) thylakoid (Demé et al., 2014) and hydrogenated (Buseman et al., 2006). Lipids then were separated by HPLC and quantified by tandem mass spectrometry. Lipid classes were separated using an Agilent 1200 HPLC system using a 150-mm × 3-mm (length × i.d.) 5- μ m diol column (Macherey-Nagel) at 40°C. The mobile phases consisted of hexane:isopropanol:water:1 M ammonium acetate, pH 5.3 (625:350:24:1, v/v/v/v; A), and isopropanol:water:1 M ammonium acetate, pH 5.3 (850:149:1, v/v/v; B). The injection volume was 20 μ L. After 5 min, the percentage of B was increased linearly from 0% to 100% in 30 min and kept at 100% for 15 min. This elution sequence was followed by a return to 100% A in 5 min and an equilibration for 20 min with 100% A before the next injection, leading to a total run time of 70 min. The flow rate of the mobile phase was 200 μ L min⁻¹. The distinct glycerophospholipid classes were eluted successively as a function of the polar head group.

Mass spectrometric analysis was performed on a 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent) equipped with a jet stream electrospray ion source under the following settings: drying gas heater at 260°C, drying gas flow at 13 L min⁻¹, sheath gas heater at 300°C, sheath gas flow at 11 L min⁻¹, nebulizer pressure at 25 p.s.i., capillary voltage at \pm 5,000 V, and nozzle voltage at \pm 1,000 V. Nitrogen was used as the collision gas. PC and DGTA analyses were carried out in positive ion mode by scanning for precursors of mass-to-charge ratio 184 and 236, respectively, at collision energy (CE) of 34 and 52 eV. SQDG analysis was carried out in negative ion mode by scanning for precursors of mass-to-charge ratio $-$ 225 at CE of $-$ 56 eV. Phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, PG, MGDG, and DGDG measurements were performed in positive ion mode by scanning for neutral losses of 141, 277, 189, 179, and 341 D at CEs of 20, 12, 16, 8, and 8 eV, respectively. Diacylglycerol and TAG species were identified and quantified by multiple reaction monitoring as singly charged ions [M+NH₄]⁺ at CE of 16 and 22 eV, respectively. Each lipid species was quantified by multiple reaction monitoring with a 50-ms dwell time and the various transitions recorded previously (Abida et al., 2015). Mass spectra were processed using the MassHunter Workstation software (Agilent) for the identification and quantification of lipids. Lipid amounts (pmol) were corrected for response differences between internal standards and endogenous lipids and by comparison with a qualified control. Qualified control extracts correspond to a known *P. tricornutum* lipid extract qualified previously and quantified by thin-layer chromatography and gas chromatography coupled to flame ionization detection, as described earlier (Jouhet et al., 2017).

Isoprostanoid Extraction and Mass Spectrometry Analyses

Samples (30 mg dry weight) of *P. tricornutum* cells were ground for 30 s into 1 mL of 0.025% (w/v) butylated hydroxytoluene in methanol, using a FastPrep-24 (MP Biomedicals) homogenizer set at maximum velocity (6.5 m s⁻¹). Samples were then transferred to clean vials, to which were added 1 mL of MeOH, 1.5 mL of phosphate buffer (pH 2), and 6 μ L of isoprostanoid internal standard mix. This mixture was stirred for 1 h at 100 rpm (1.7g) at room temperature. Then, samples were centrifuged at 3,000g for 5 min. The supernatant was recovered, and 4 mL of cold chloroform was added. Samples were then stirred for 30 s and centrifuged at 3,000g for 5 min at room temperature. The chloroform phase was separated and concentrated under nitrogen (0.7 bar) at 40°C during 1 h. Hydrolysis then was performed with 950 μ L of 1 M KOH mixed during 30 min at 40°C. At the end, 1 mL of 0.04 M formic acid (pH 4.5) was added. Then, a solid phase extraction procedure was performed with Oasis MAX mixed polymer phase cartridges, preconditioned with 2 mL of methanol and equilibrated with 2 mL of formic acid (0.02 M, pH 4.5). Samples were loaded onto the cartridges, and successive washings were performed using 2 mL of 2% (v/v) NH₃, 2 mL of a methanol:formic acid (0.02 M, pH 4.5) mixture (30:70), 2 mL of hexane, and 2 mL of a hexane:ethyl acetate mixture (70:30). Columns were dried for 5 min. The retained PhytoPs, NeuroPs, and IsoPs were collected following two elutions with 1 mL of a hexane:ethanol:acetic acid mixture (70:29.4:0.6). Samples were concentrated under nitrogen at 40°C for 30 min and reconstituted in 100 μ L of mobile phase (solvent A, water with 0.1% formic acid; solvent B, acetonitrile:MeOH, 8:2 [v/v] with 0.1% formic acid; A/B ratio, 83:17) for injection. Isoprostanoids were separated as described earlier (Vigor et al., 2018). Mass spectrometry analyses were performed using an AB SCIEX QTRAP 5500 (Sciex Applied Biosystems). The ionization source was electrospray, operated in negative mode. The source voltage was kept at \times 4.5 kV, and N₂ was used as the curtain gas. Detection of the fragmentation ion products from each PhytoP, NeuroP, and IsoP deprotonated molecule

[M-H]⁻ was performed in multiple reaction monitoring mode. Quantification of PhytoPs, NeuroPs, and IsoPs was carried out by measuring the area under the specific peak using MultiQuant 3.0 software (Sciex Applied Biosystems). Area values were normalized to the cell concentration. The concentration of the analytes was obtained by calibration curves calculated by the area ratio of the analytes and the isoprostanoid internal standard (Vigor et al., 2018).

Genomic Sequence Analyses

The search for genes coding for potential homologs of reference sequences characterized in other organisms, such as human or *Arabidopsis thaliana*, was achieved using BLAST (Altschul et al., 1990). Reference genes were selected in the Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) and TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) databases. Parameters selected for BLAST searches were as follows: scoring matrix, Blosum62; penalty for gap opening, 11; penalty for gap extension, 1; and with a filter for low-complexity regions. The last version of the *P. tricornutum* genome was obtained via the Ensembl portal (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum).

Statistical Analyses

Analyses were performed in biological triplicates. Statistical analyses were achieved using GraphPad Prism software 6.07 (GraphPad Software). One-way and two-way ANOVA followed by Dunnett's posthoc test were carried out. The difference between groups was considered significant at $P \leq 0.05$.

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Examples of enzymatic prostanoids from plants and animals and of nonenzymatic isoprostanoids.

Supplemental Figure S2. Effect of H₂O₂ on *P. tricornutum* cells after 48 h of treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Amandine Rocher, Valerie Bultel, and Alexandre Guy for isoprostanoid analyses.

Received July 30, 2018; accepted September 11, 2018; published September 20, 2018.

LITERATURE CITED

- Abida H, Dolch LJ, Meï C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, (2015) Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* **167**: 118–136
- Allen AE, Laroche J, Maheswari U, Lommer M, Schauer N, Lopez PJ, Finazzi G, Fernie AR, Bowler C (2008) Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* to iron starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 10438–10443
- Allouret G, Courtois F, Chevalier F, Lerbs-Mache S (2013) Plastid gene expression during chloroplast differentiation and dedifferentiation into non-photosynthetic plastids during seed formation. *Plant Mol Biol* **82**: 59–70
- Altschul SE, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410
- Andreou A, Feussner I (2009) Lipoxygenases: structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* **70**: 1504–1510
- Andreou A, Brodhun F, Feussner I (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res* **48**: 148–170
- Arao T, Yamada M (1994) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* **35**: 1177–1181
- Arao T, Kawaguchi A, Yamada M (1987) Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* **26**: 2573–2576
- Arao T, Sakaki T, Yamada M (1994) Biosynthesis of polyunsaturated lipids in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* **36**: 629–635

- Bailey AP, Koster G, Guillermier C, Hirst EM, MacRae JI, Lechene CP, Postle AD, Gould AP (2015) Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of *Drosophila*. *Cell* **163**: 340–353
- Barbosa M, Collado-González J, Andrade PB, Ferreres F, Valentão P, Galano JM, Durand T, Gil-Izquierdo Á (2015) Nonenzymatic α -linolenic acid derivatives from the sea: macroalgae as novel sources of phytoprostanes. *J Agric Food Chem* **63**: 6466–6474
- Benoiston AS, Ibarbalz FM, Bittner L, Guidi L, Jahn O, Dutkiewicz S, Bowler C (2017) The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **372**: 372
- Blée E (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* **37**: 33–72
- Blée E (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**: 315–322
- Buchan A, LeCleir GR, Gulvik CA, González JM (2014) Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* **12**: 686–698
- Burch AR, Franz AK (2016) Combined nitrogen limitation and hydrogen peroxide treatment enhances neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresour Technol* **219**: 559–565
- Buseman CM, Tamura P, Sparks AA, Baughman EJ, Maatta S, Zhao J, Roth MR, Esch SW, Shah J, Williams TD, (2006) Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **142**: 28–39
- Butler WL, Kitajima M (1975) Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **376**: 116–125
- Casotti R, Mazza S, Brunet C, Vantrepotte V, Ianora A, Miralto A (2005) Growth inhibition and toxicity of the diatom aldehyde 2-trans,4-trans-decadienal on *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J Phycol* **41**: 7–20
- Collado-González J, Durand T, Ferreres F, Medina S, Torrecillas A, Gil-Izquierdo Á (2015) Phytoprostanes. *Lipid Technol* **27**: 127–130
- Collins JR, Edwards BR, Fredricks HF, Van Mooy BAS (2016) LOBSTAHS: an adduct-based lipidomics strategy for discovery and identification of oxidative stress biomarkers. *Anal Chem* **88**: 7154–7162
- Conte M, Lupette J, Seddiki K, Meï C, Dolch LJ, Gros V, Barette C, Rébeillé E, Jouhet J, Maréchal E (2018) Screening for biologically annotated drugs that trigger triacylglycerol accumulation in the diatom *Phaeodactylum*. *Plant Physiol* **177**: 532–552
- Cooksey KE, Guckert JB, Williams SA, Callis PR (1987) Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *J Microbiol Methods* **6**: 333–345
- Curien G, Flori S, Villanova V, Magneschi L, Giustini C, Forti G, Matringe M, Petroutsos D, Kuntz M, Finazzi G (2016) The water to water cycles in microalgae. *Plant Cell Physiol* **57**: 1354–1363
- Demé B, Cataye C, Block MA, Maréchal E, Jouhet J (2014) Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J* **28**: 3373–3383
- Di Dato V, Orefice I, Amato A, Fontanarosa C, Amoresano A, Cutignano A, Ianora A, Romano G (2017) Animal-like prostaglandins in marine microalgae. *ISME J* **11**: 1722–1726
- Dolch LJ, Maréchal E (2015) Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Drugs* **13**: 1317–1339
- Dolch LJ, Lupette J, Tourcier G, Bedhomme M, Collin S, Magneschi L, Conte M, Seddiki K, Richard C, Corre E, (2017) Nitric oxide mediates nitrite-sensing and acclimation and triggers a remodeling of lipids. *Plant Physiol* **175**: 1407–1423
- Durand T, Guy A, Henry O, Roland A, Bernad S, El Fangour S, Vidal JP, Rossi JC (2004) Total syntheses of iso-, neuro- and phytoprostanes: new insight in lipid chemistry. *Chem Phys Lipids* **128**: 15–33
- El Fangour S, Guy A, Vidal JP, Rossi JC, Durand T (2005) A flexible synthesis of the phytoprostanes B1 type I and II. *J Org Chem* **70**: 989–997
- Falciatore A, d'Alcalá MR, Croot P, Bowler C (2000) Perception of environmental signals by a marine diatom. *Science* **288**: 2363–2366
- Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275–297
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871–1875
- Galano JM, Lee YY, Oger C, Vigor C, Vercauteren J, Durand T, Giera M, Lee JC (2017) Isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: an overview of 25 years of research in chemistry and biology. *Prog Lipid Res* **68**: 83–108
- Gallina AA, Palumbo A, Casotti R (2016) Oxidative pathways in response to polyunsaturated aldehydes in the marine diatom *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyceae). *J Phycol* **52**: 590–598
- Gerecht A, Romano G, Ianora A, d'Ippolito G, Cutignano A, Fontana A (2011) Plasticity of oxylipin metabolism among clones of the marine diatom *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyceae). *J Phycol* **47**: 1050–1056
- Guy A, Oger C, Heppekausen J, Signorini C, De Felice C, Fürstner A, Durand T, Galano JM (2014) Oxygenated metabolites of n-3 polyunsaturated fatty acids as potential oxidative stress biomarkers: total synthesis of 8-F3t-IsoP, 10-F4t-NeuroP and [D4]-10-F4t-NeuroP. *Chemistry* **20**: 6374–6380
- Guy A, Flanagan S, Durand T, Oger C, Galano JM (2015) Facile synthesis of cyclopentenone B1- and L1-type phytoprostanes. *Front Chem* **3**: 41
- Ibrahim A, Mbodji K, Hassan A, Aziz M, Boukhetala N, Coëffier M, Savoye G, Déchelotte P, Marion-Letellier R (2011a) Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium. *Clin Nutr* **30**: 678–687
- Ibrahim A, Schütz AL, Galano JM, Herrfurth C, Feussner K, Durand T, Brodhun F, Feussner I (2011b) The alphabet of galactolipids in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **2**: 95
- Imbusch R, Mueller MJ (2000) Formation of isoprostane F(2)-like compounds (phytoprostanes F(1)) from α -linolenic acid in plants. *Free Radic Biol Med* **28**: 720–726
- Jahn U, Galano JM, Durand T (2010) A cautionary note on the correct structure assignment of phytoprostanes and the emergence of a new prostane ring system. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **82**: 83–86
- Janssen LJ (2001) Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**: L1067–L1082
- Johnson X, Vandystadt G, Bujaldon S, Wollman FA, Dubois R, Roussel P, Alric J, Béal D (2009) A new setup for in vivo fluorescence imaging of photosynthetic activity. *Photosynth Res* **102**: 85–93
- Jouhet J, Maréchal E, Bligny R, Joyard J, Block MA (2003) Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett* **544**: 63–68
- Jouhet J, Lupette J, Clerc O, Magneschi L, Bedhomme M, Collin S, Roy S, Maréchal E, Rébeillé F (2017) LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. *PLoS ONE* **12**: e0182423
- Li W, Gao K, Beardall J (2012) Interactive effects of ocean acidification and nitrogen-limitation on the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE* **7**: e51590
- Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, von Rad U, Durner J, Mueller MJ (2005) B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol* **137**: 328–340
- Long EK, Murphy TC, Leiphon LJ, Watt J, Morrow JD, Milne GL, Howard JR, Picklo MJ Sr (2008) Trans-4-hydroxy-2-hexenal is a neurotoxic product of docosahexaenoic (22:6; n-3) acid oxidation. *J Neurochem* **105**: 714–724
- Longini M, Belvisi E, Proietti F, Bazzini F, Buonocore G, Perrone S (2017) Oxidative stress biomarkers: establishment of reference values for isoprostanes, AOPP, and NPBI in cord blood. *Mediators Inflamm* **2017**: 1758432
- Lupette J, Maréchal E (2018) Phytoplankton glycerolipids, challenging but promising prospects from biomedicine to green chemistry and biofuels. In S La Barre, SS Bates, eds, *Blue Technologies: Production and Use of Marine Molecules*. Wiley VCH, Weinheim, Germany, pp 191–215
- Mallick N, Mohn FH (2000) Reactive oxygen species: response of algal cells. *J Plant Physiol* **157**: 183–193
- McCarthy JK, Smith SR, McCrow JP, Tan M, Zheng H, Beerli K, Roth R, Lichte C, Goodenough U, Bowler CP, (2017) Nitrate reductase knockout uncouples nitrate transport from nitrate assimilation and drives repartitioning of carbon flux in a model pennate diatom. *Plant Cell* **29**: 2047–2070
- Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS, Roberts LJ II (2011) Isoprostane generation and function. *Chem Rev* **111**: 5973–5996
- Miralto A, Barone G, Romano G, Poulet SA, Ianora A, Russo GL, Buttino I, Mazzarella G, Laabir M, Cabrini M, (1999) The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature* **402**: 173–176
- Misra AN, Misra M, Singh R (2012) Chlorophyll fluorescence in plant biology. In AN Misra, ed, *Biophysics*. InTech, Rijeka, Croatia, pp 171–192
- Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ II (2004) Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* **18**: 1791–1800
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ II (1990) A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9383–9387

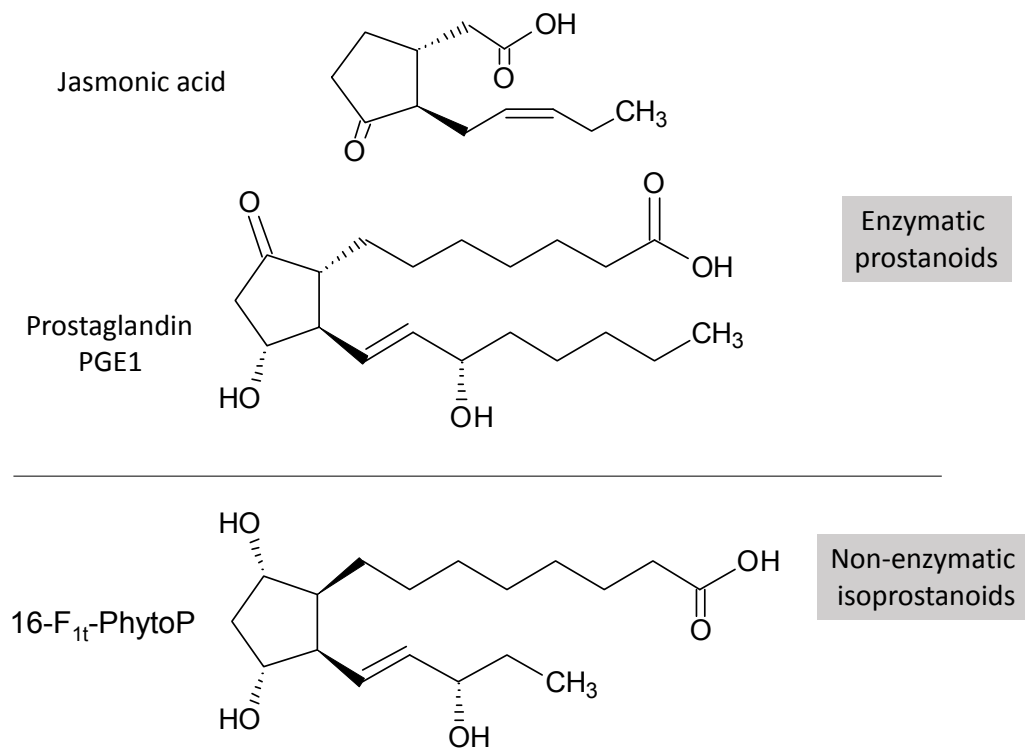
- Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ II (1992) Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10721–10725
- Mueller S, Hilbert B, Dueckershoff K, Roitsch T, Krischke M, Mueller MJ, Berger S (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 768–785
- Mullineaux PM, Exposito-Rodriguez M, Laissue PP, Smirnov N (2018) ROS-dependent signalling pathways in plants and algae exposed to high light: comparisons with other eukaryotes. *Free Radic Biol Med* **122**: 52–64
- Nourooz-Zadeh J, Liu EHC, Anggård E, Halliwell B (1998) F4-isoprostanes: a novel class of prostanoids formed during peroxidation of docosahexaenoic acid (DHA). *Biochem Biophys Res Commun* **242**: 338–344
- Oger C, Bultel-Poncé V, Guy A, Balas L, Rossi JC, Durand T, Galano JM (2010) The handy use of Brown's P2-Ni catalyst for a skipped diyne deuteration: application to the synthesis of a [D4]-labeled F4t-neuroprostane. *Chemistry* **16**: 13976–13980
- Parchmann S, Mueller MJ (1998) Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from α -linolenic acid in plants. *J Biol Chem* **273**: 32650–32655
- Popko J, Herrfurth C, Feussner K, Ischebeck T, Iven T, Haslam R, Hamilton M, Sayanova O, Napier J, Khozin-Goldberg I (2016) Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE* **11**: e0164673
- Roberts LJ II, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD, Morrow JD (1998) Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* **273**: 13605–13612
- Roháček K, Bertrand M, Moreau B, Jacquette B, Caplat C, Morant-Manceau A, Schoefs B (2014) Relaxation of the non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in diatoms: kinetics, components and mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**: 20130241
- Roy J, Galano JM, Durand T, Le Guennec JY, Lee JC (2017) Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. *FASEB J* **31**: 3729–3745
- Sattler SE, Mène-Saffrané L, Farmer EE, Krischke M, Mueller MJ, DellaPenna D (2006) Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell* **18**: 3706–3720
- Scala S, Bowler C (2001) Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1666–1673
- Simionato D, Block MA, La Rocca N, Jouhet J, Maréchal E, Finazzi G, Morosinotto T (2013) The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryot Cell* **12**: 665–676
- Strassburg K, Huijbrechts AM, Kortekaas KA, Lindeman JH, Pedersen TL, Dane A, Berger R, Brenkman A, Hankemeier T, van Duynhoven J, (2012) Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. *Anal Bioanal Chem* **404**: 1413–1426
- Taddei L, Stella GR, Rogato A, Bailleul B, Fortunato AE, Annunziata R, Sanges R, Thaler M, Lepetit B, Lavaud J, (2016) Multisignal control of expression of the LHCX protein family in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot* **67**: 3939–3951
- Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Krischke M, Steffan B, Roitsch T, Mueller MJ (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J* **34**: 363–375
- Vardi A, Formiggini F, Casotti R, De Martino A, Ribalet F, Miralto A, Bowler C (2006) A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatoms. *PLoS Biol* **4**: e60
- Vigor C, Reversat G, Rocher A, Oger C, Galano JM, Vercauteren J, Durand T, Tonon T, Leblanc C, Potin P (2018) Isoprostanoïds quantitative profiling of marine red and brown macroalgae. *Food Chem* **268**: 452–462
- Vu HS, Tamura P, Galeva NA, Chaturvedi R, Roth MR, Williams TD, Wang X, Shah J, Welti R (2012) Direct infusion mass spectrometry of oxylipin-containing *Arabidopsis* membrane lipids reveals varied patterns in different stress responses. *Plant Physiol* **158**: 324–339
- Warring SD, Dou Z, Carruthers VB, McFadden GI, van Dooren GG (2014) Characterization of the chloroquine resistance transporter homologue in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* **13**: 1360–1370
- Wenk MR (2010) Lipidomics: new tools and applications. *Cell* **143**: 888–895

Non-enzymatic synthesis of bioactive isoprostanooids in the diatom *Phaeodactylum* following oxidative stress

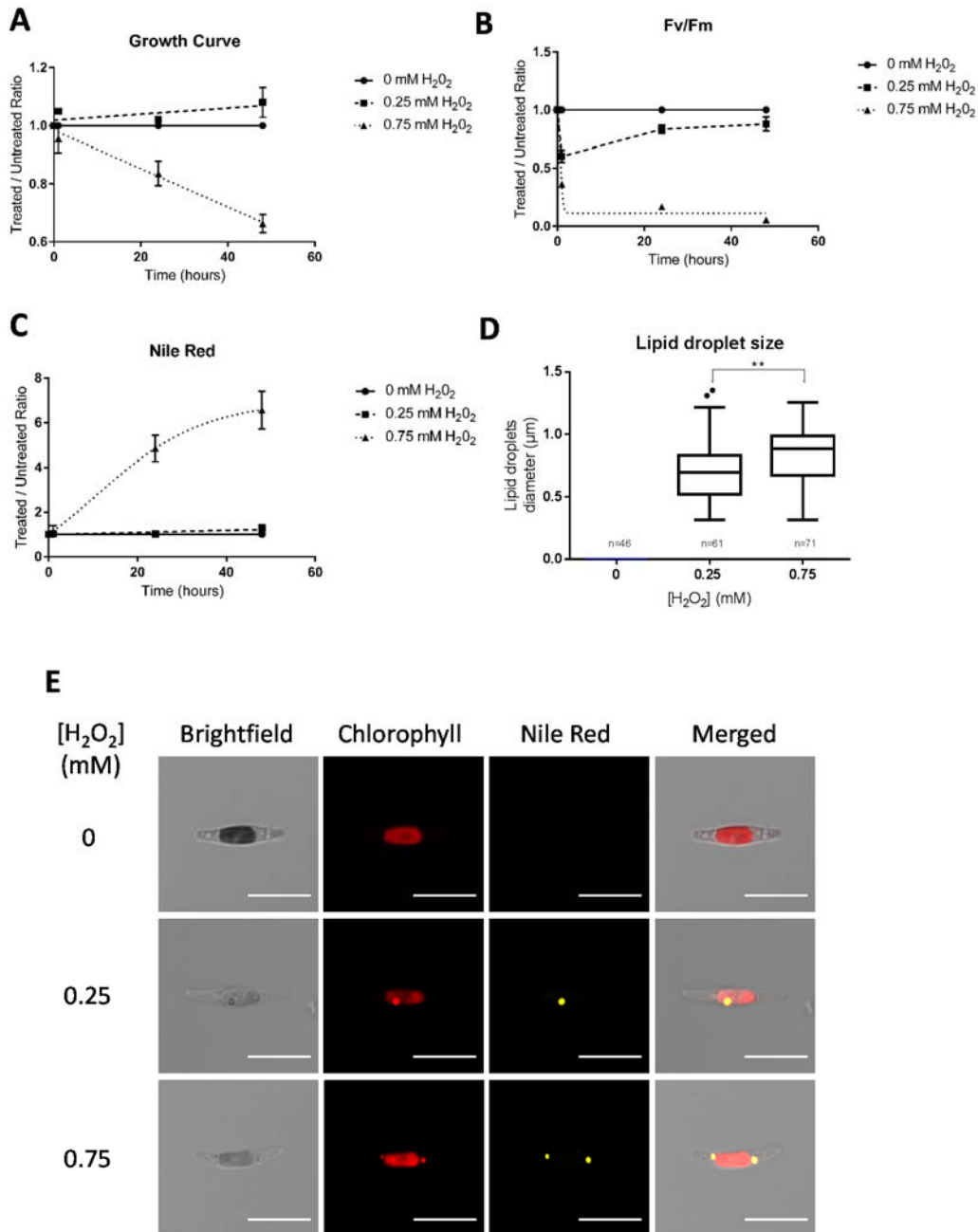
Josselin Lupette, Antoine Jaussaud, Claire Vigor, Camille Oger, Jean-Marie Galano, Guillaume Réversat, Joseph Vercauteren, Juliette Jouhet, Thierry Durand, Eric Maréchal

-

Supplemental Figures



Supplemental Figure S1: Examples of enzymatic prostanooids from plants (jasmonic acid) and animals (prostaglandin PGE1) and of non-enzymatic isoprostanooids (16-F_{1t}-PhytoP)



Supplemental Figure S2: Effect of hydrogen peroxide on *Phaeodactylum tricornutum* cells after 48 hours of treatment. Values correspond to three biological replicates. The incubation was performed in a volume of 50 mL, inoculated at $5 \cdot 10^6$ cells mL⁻¹. Analyzes were performed at the indicated concentration of H₂O₂ and indicated time. Unless otherwise stated, analyzes were performed 48 h after treatment. **A, Growth curve.** The abundance of cells was expressed compared to untreated control **B, Nile Red.** Nile Red staining was performed as described in the Method section and was expressed compared to untreated control. **C, Photosystem II quantum efficiency (Fv/Fm).** Fv/Fm was measured via chlorophyll fluorescence as described in the Method section and expressed compared to untreated control. **D, Lipid droplet radius** (n = number of cells counted) measured using Image J software. **E, Confocal microscopy of *Phaeodactylum* cells.** Representative cells were observed using a using a Zeiss LSM800 confocal laser scanning microscope equipped with a Zeiss Plan-APO x63-numerical aperture 1.46 oil immersion objective and enlarged x4. Nile Red fluorescence was monitored by excitation at 488 nm and capture zone ranging from 579 nm to 641 nm. Statistically relevant responses (ANOVA one-way with Dunnett's post hoc test) are indicated by stars (***). Scale bar, 10 µm.

Chapitre 4 :
Architecture de la gouttelette lipidique
de *Phaeodactylum tricornutum*

1. Préambule

Dans leur environnement, les microalgues sont soumises à des variations des conditions environnementales pouvant stresser leur métabolisme. Nous avons pu voir dans les résultats des chapitres 1, 2 et 3 que des stress effectués avec des composés tels que le 17 α -éthynylestradiol (Conte et al., 2018), le monoxyde d'azote (Dolch et al., 2017) ou le peroxyde d'hydrogène (Burch & Franz, 2016, Collins et al., 2016, Lupette et al., 2018) favorisaient l'accumulation de TAG sous forme de gouttelettes lipidiques. Nous avons distingué dans la partie 2 des données bibliographiques que les gouttelettes lipidiques sont des structures hautement conservées à l'échelle du vivant. De surcroît, leur architecture globale varie peu en fonction des modèles d'études : un cœur hydrophobe dont la composition est variable selon les organisme (TAG, stérol esters, cérides, pigments hydrophobes, alkénome, polyhydroxyalkanolates), entouré d'une monocouche de lipides polaires dans laquelle s'enchâssent des protéines de classe I (avec un motif hydrophobe en épingle à cheveux) ou de classe II (avec une ou plusieurs hélices amphipathiques) (Kory et al., 2016).

Une première étude sommaire du protéome de la gouttelette lipidique a été publiée lors de ma première année de thèse (Yoneda et al., 2016). Cette étude a révélé la présence de cinq protéines majeures à la surface de la gouttelette lipidique : une Straménopile Lipid Droplet Protein (StLDP, Phatr48859), une acyl-CoA-binding protein (Phatr48778), une heat shock protein (HSP70, Phatr54019), ainsi que deux protéines hypothétiques impliquées dans des fonctions redox (Phatr45894 et Phatr49981). Les auteurs ont caractérisé le fonctionnement de la StLDP comme une protéine de 456 acides aminés, présentant un domaine hydrophobe de 54 acides aminés formant un motif X₇PX₉PX₁₀PX₃PX₂₃ (Données Bibliographiques - Partie 2). La StLDP est donc une protéine de type I (Kory et al., 2016). La localisation de la StLDP a été de plus récemment confirmée à la surface de la gouttelette lipidique (Yoneda et al., 2018).

L'article 4 présente la dissection de l'architecture de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum*. Dans un premier temps, nous avons apporté des ajustements au protocole précédemment publié (Yoneda et al., 2016) afin d'augmenter la pureté de la fraction obtenue, notamment en effectuant un chargement par le bas du tube avant ultracentrifugation (Brasaemle et al., 1997, Brasaemle & Wolins, 2016). En effet, en répétant dans un premier temps l'expérimentation de Yoneda et al., avec un chargement au sommet du tube, sur un coussin de saccharose, nous avons obtenu un haut degré de contamination au niveau du glycérolipidome, révélant 40% de MGDG, et plus de 1800 protéines dans la fraction purifiée.

Suite à la mise en œuvre du protocole optimisé, le glycérolipidome a tout d'abord été établi : la gouttelette lipidique présente 99 % de TAG dans la fraction purifiée révélant un haut degré de pureté. De surcroît, nous détectons également la présence de faibles proportions de SQDG et PC, ainsi que deux espèces moléculaires de DGTA (20:5-16:1 et 20:5-16:2) suggérant que ces trois glycérolipides constituent la monocouche de lipides polaires de la gouttelette lipidique. L'origine de la monocouche de lipides polaires (réticulum endoplasmique, membrane la plus externe du chloroplaste) est discutée dans l'article 4. L'analyse des stérols de la fraction lipidique révèle l'unique présence de brassicastérol, précédemment identifié chez *Phaeodactylum* (Fabris et al., 2014). De par ses propriétés physiques, le brassicastérol serait également un composant de la monocouche de lipides polaires. Aucun stérol esters n'a été détecté. La fraction purifiée présentant une couleur jaune pâle, nous avons décidé d'effectuer une analyse comparative de la composition en pigments de la gouttelette lipidique par rapport aux extraits totaux. Un enrichissement spécifique en β -carotène a ainsi été détecté dans la gouttelette lipidique purifiée.

Une analyse protéomique de la gouttelette lipidique a ensuite été réalisée à partir de fractions obtenues suite à 3 purifications indépendantes. Nous avons détecté la présence de 326 protéines. Après application de deux filtres successifs, (i) stringence peptidique supérieure ou égale à 3 peptides tryptiques et (ii) comparaison des protéomes des extraits totaux en condition riche et carencée en azote, afin de ne pas retenir les protéines dont la quantité diminue significativement en carence, nous avons focalisé notre étude sur 86 protéines. Celles-ci sont impliquées dans plusieurs grandes catégories structurales et fonctionnelles : métabolisme (19 protéines) ; association à des organites membranaires (9 protéines) ; chaperonnes, repliement des protéines, modifications post-traductionnelles et contrôle qualité (12 protéines) ; dynamique du cytosquelette (3 protéines) ; traitement de l'information génétique (15 protéines) ; structuration des plastoglobules et composants des thylakoïdes (18 protéines) et protéines de fonctions inconnues (10 protéines). Parmi ces 86 protéines, trois (StLDP, HSP70 et Acyl-CoA-binding protein) sont présentes dans le protéome précédemment publié (Yoneda et al., 2016). Une discussion générale du protéome de la gouttelette lipidique est présentée dans l'article 4 mettant en lumière un rôle possible comme une structure de stockage de protéines pendant la carence en azote (en particulier d'histones) et une connexion avec le système endomembranaire (en particulier les systèmes de trafic vésiculaire).

La localisation de plusieurs protéines détectées dans le protéome est actuellement en cours par expression de protéines fusionnées à la eGFP. Ces données ne seront pas présentées

dans le manuscrit de thèse, mais la méthodologie employée est présentée dans le matériel et méthodes.

2. Article 4

Article 4 : Lupette, J., Jaussaud, A., Seddiki, K., Morabito, C., Brugière, S., Schaller, H., Kuntz, M., Putaux, J.L., Jouneau, P.H., Rébeillé, F., Falconet, D., Coute, Y., Jouhet, J., Tardif, M., Salvaing, J., Maréchal, E. The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum*. ***Algal Research***. 38 :101415.



The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*

Josselin Lupette^a, Antoine Jaussaud^a, Khawla Seddiki^{a,1}, Christian Morabito^a, Sabine Brugière^b, Hubert Schaller^c, Marcel Kuntz^a, Jean-Luc Putaux^d, Pierre-Henri Jouneau^e, Fabrice Rébeillé^a, Denis Falconet^a, Yohann Couté^b, Juliette Jouhet^a, Marianne Tardif^b, Juliette Salvaing^a, Eric Maréchal^{a,*}

^a Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS, CEA, INRA, Université Grenoble Alpes, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, CEA Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France

^b Laboratoire de Biologie à Grandes Echelles, Université Grenoble Alpes, CEA, Inserm, Institut de Biosciences Biotechnologies de Grenoble, CEA Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, France.

^c Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, 12 Rue du général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France.

^d Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), CNRS, Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France.

^e Laboratoire d'Etudes des Matériaux par Microscopie Avancée, Institut Nanosciences et Cryogénie, Service de Physique des matériaux et Microstructures, CEA-Grenoble; 17 rue des Martyrs, 38000 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Diatoms
Phaeodactylum
Secondary plastid
Lipid droplets
Triacylglycerol
Betaine lipid
Carotenoids
Histones

ABSTRACT

Diatoms are a major phylum of phytoplankton biodiversity and a resource considered for biotechnological developments, as feedstock for biofuels and applications ranging from food, human health or green chemistry. They contain a secondary plastid limited by four membranes, the outermost one being connected with the endoplasmic reticulum (ER). Upon nitrogen stress, diatoms reallocate carbon to triacylglycerol storage inside lipid droplets (LDs). The comprehensive glycerolipid and sterol composition and the architecture of diatom LDs are unknown. In *Phaeodactylum tricornutum*, LDs are in contact with plastid, mitochondria and uncharacterized endomembranes. We purified LDs from nitrogen-starved *P. tricornutum* cells to high purity level (99 mol% triacylglycerol of total glycerolipids). We used the Stramenopile Lipid Droplet Protein (StLDP) as a previously validated marker for the identity of *P. tricornutum* LD. Amphipathic lipids surrounding LDs consist of a betaine lipid, diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl- β -alanine (0.4 mol%); sulfoquinovosyldiacylglycerol (0.35 mol%); phosphatidylcholine (0.15 mol%) and one sterol, brassicasterol. By contrast with whole cell extracts, the betaine lipid from LDs only contains eicosapentaenoic acid paired with palmitoleic or palmitolenic acids. This polar lipid composition suggests a budding of LDs from the cytosolic leaflet of the plastid outermost membrane. LD pigments reveal a specific accumulation of β -carotene. The LD proteome obtained from three independent biological replicates, based on stringent filtering of extracted data, and following subtraction of proteins downregulated by nitrogen starvation, highlights a core proteome of 86 proteins, including StLDP. LD-associated proteins suggest connections with vesicular trafficking (coatamer, clathrin), cytoskeleton, plastid and mitochondria. Unsuspected LD-associated function includes protein synthesis (ribosomes), folding (chaperones), posttranslational modifications and quality control (ubiquitination and ERAD pathway), possibly preparing translation of specific mRNAs. The detection of histone proteins, as previously demonstrated in drosophila embryo LDs, also suggests the storage of nucleosome components, preparing cell division and chromatin packaging, when cells are not stressed anymore.

1. Introduction

The biodiversity of phytoplankton is immense [1], ranging from cyanobacteria to photosynthetic eukaryotes that contain either a chloroplast inherited from a primary endosymbiosis, like in green algae,

[2–4] or a complex photosynthetic organelle inherited from a secondary endosymbiosis, like in heterokonts [5–7]. Diatoms represent one of the largest groups of heterokonts, dominating oceanic and fresh water ecosystems, and contributing significantly to biogeochemical cycles, both as primary producers at the basis of food webs and as

* Corresponding author.

E-mail address: eric.marechal@cea.fr (E. Maréchal).

¹ Present address: Proteomics Platform Center, Centre de recherche du CHU de Québec, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec City, Québec, Canada.

carriers of carbon and silicon toward the ocean interior [8]. Diatoms have also attracted the attention as a promising resource for biotechnological developments, as feedstock for biofuels and applications ranging from food, human health or green chemistry [9–12]. In spite of their importance in eukaryote's evolution, role in ecosystems and potential for biotechnologies, knowledge of diatom subcellular architecture and physiology is still poor. Efforts need to be pursued, in such models as *Phaeodactylum tricorutum* [13–15].

Diatoms living in oceans and fresh waters are permanently exposed to environmental variations and stresses. Nutrient starvation [14,16,17], high temperature [18,19], high light [19], exposure to nitric oxide [20], to hydrogen peroxide [21–23] or to a variety of chemicals [24–27] are known to trigger an intense lipid remodeling marked by an accumulation of lipid droplets (LDs) within cells. The rationale for LD formation as part of general stress responses is not fully comprehended.

LDs are ubiquitously found in prokaryotic and eukaryotic cells [28–30]. Their architecture is based on a hydrophobic core containing neutral lipids, such as triacylglycerols (TAG), steryl esters, hydrophobic pigments etc. This core is surrounded by a monolayer of polar lipids, mainly phospholipids, with embedded or transiently associated proteins [28,31]. In our current understanding and based on works achieved on yeasts or mammals, the biogenesis of LDs occurs at the outer leaflet of the endoplasmic reticulum (ER) [28,32,33]. The proteome of nascent and budding LDs can therefore include (1) ER-located enzymes synthesizing neutral lipids, such as diacylglycerol acyltransferases (DGATs) or phosphatidylcholine:diacylglycerol acyltransferases (PDATs), (2) proteins involved in LD overall assembly like seipins, and (3) structural proteins stabilizing its sub-spherical shape and protecting its hydrophobic core. In more mature LDs, associated proteins can include (4) enzymes involved in the hydrolysis of neutral lipids, mainly TAG lipases, and conversion of fatty acids into other metabolites, as well as (5) proteins involved in the docking to the cytoskeleton and organelles, such as mitochondria or peroxisomes, or eventually (6) proteins involved in other functions [28,34,35]. In each environmental and physiological context, the function of the LD depends on its protein equipment [28,34,35]. The understanding of LD architecture and function requires therefore a precise inventory of its lipophilic and protein components.

LD-associated proteins are not conserved in evolution, and it is therefore necessary to determine the proteome of LDs in each major clade. Besides the differences, a structural classification of proteins has been proposed [36], with class I proteins having a hydrophobic 'hairpin' motif, such as plant oleosins, caleosin and stereoleosins [37,38], accessing LDs from the ER either during LD formation (budding) or after LD maturation via ER–LD membrane bridges. Class II proteins, such as mammal's perilipins [36,39], access the LD surface from the cytosol, binding to LDs through amphipathic helices or other hydrophobic domains. Additional proteins can also bind to LD following protein–protein interactions [36].

Proteomic analyses of nitrogen stress-induced LDs have been conducted in cells of Chlorophyta (green algae) containing a primary plastid, like *Chlamydomonas reinhardtii* [16,40,41], *Chlorella* sp. [42], *Haematococcus pluvialis* [43], three *Dunaliella* species [44], *Scenedesmus quadricauda* [45], or *Lobosphaera incisa* [46]. All these studies have highlighted the presence of major structural proteins. In some green algae like *Chlamydomonas*, an important set of enzymes involved in TAG formation was still associated to the mature LDs, as well as components of a multimeric ABC transporter of the chloroplast envelope involved in lipid transfers, suggesting a role of this organelle in providing precursors for some of the TAGs accumulating in LDs [16].

In diatoms, by contrast, the secondary plastid is delineated by four membranes and the outermost one is continuous with the nuclear envelope and therefore connected to the endomembrane system, including the ER [47] (Fig. 1). The outermost membrane of the plastid, or epiplastid membrane (EpM) [7] is therefore likely to share some

functions with the ER. The electron microscopy images of cells of the pennate diatom *P. tricorutum* shows tight connections between the LD and the EpM (LD–EpM contact sites), endomembrane vesicles (LD–endomembrane contact sites) and the mitochondria outer envelope membrane (LD–mitochondria contact sites) [47] (Fig. 1). It is not known whether the LD–EpM contact corresponds to a site of LD biogenesis, following the proposed model of LD-budding from the ER in mammal and yeast cells, or if it corresponds to independent functional interactions. Based on electron microscopy, it is not yet possible to determine whether endomembrane vesicles interacting with the LD correspond to the ER, peroxisomes or other compartments. LD–mitochondria contact sites are also observed [47] (Fig. 1), consistently with a docking to an organelle, where beta-oxidation of FAs could occur. The proteome of diatom LDs could possibly comprise proteins involved in these inter-organelle interactions.

Recent proteomic studies of nitrogen stress induced LDs in photosynthetic heterokonts have been performed in the pennate diatoms *Fistulifera solaris* [48] and *P. tricorutum* [49], allowing the identification of 15 and 5 putative LD proteins respectively, as well as in the eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* [50]. These studies have mostly focused on the search for major structural proteins covering the surface of the LDs and ensuring its stability and controlling its size.

Here we addressed the architecture of the mature LD induced by nitrogen starvation, inside the cells of *P. tricorutum*. In LD-enriched fractions purified on a sucrose density gradient, five proteins have been previously described, i.e. a major Stramenopile LD Protein (StLDP - Phatr3_J48859), an Acyl-CoA-binding protein (Phatr3_J48778), a heat shock protein (HSP70 - Phatr3_J54019) and two hypothetical proteins possibly involved in redox reactions (Phatr3_J45894 and Phatr3_J49981) [49]. The StLDP is a class I protein of 456 amino acids (49 kDa) having a hydrophobic domain of 54 amino acids (in position 222–275) forming a pattern X₇PX₉PX₁₀PX₃PX₂₃ (with P a proline) [49]. The expression of the *stldp* gene is upregulated upon nitrogen starvation [49].

The location of the StLDP at the LD has been confirmed based on GFP-fusion imaging [51]. The StLDP is therefore a validated marker of *Phaeodactylum* LD induced by nitrogen starvation. In the present study, we refined the method to prepare highly purified LDs from *P. tricorutum* cells and performed a comprehensive analysis of the lipids, pigments and proteome, allowing the characterization of LD components and revealing unsuspected roles.

2. Materials and methods

2.1. Cultivation of *Phaeodactylum tricorutum*

Phaeodactylum tricorutum (Pt1) Bohlin Strain 8.6 CCMP2561 (Culture Collection of Marine Phytoplankton, now known as NCMA: National Center for Marine Algae and Microbiota) was used in all experiments. Pt1 cells were maintained and grown in a volume of 1 L in 2-L flasks at 20 °C, in a modified ESAW (Enriched Seawater, Artificial Water) medium (NaCl 362.7 mM; Na₂SO₄ 25 mM; KCl 8.03 mM; NaHCO₃ 2.067 mM; KBr 0.725 mM; H₃BO₃ 0.372 mM; NaF 0.0657 mM; MgCl₂ 47.18 mM; CaCl₂ 9.134 mM; SrCl₂ 0.082 mM; Na₂-glycerophosphate 21.8 μM; Na₂SiO₃ 105.6 μM; disodium ethylenediaminetetraacetate dehydrate (Na₂EDTA) 14.86 μM; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 5.97 μM; FeCl₃ 0.592 μM; MnSO₄ 2.42 μM; ZnSO₄ 0.254 μM; CoSO₄ 0.0569 μM; Na₂MoO₄ 0.52 μM; H₃BO₃ 61.46 μM; Na₂SeO₃ 10 nM; biotin (vitamin H) 8.18 nM; cobalamin (vitamin B₁₂) 2.94 nM; thiamine (vitamin B₁) 0.594 μM [52] using ten times enriched nitrogen and phosphate sources (10N10P containing 5.49 mM NaNO₃ and 0.224 mM NaH₃PO₄) [14]. Nitrogen starvation was performed by transferring cells to the same medium without any addition of NaNO₃ (00N10P medium). Cells were grown on a 12:12 light (50 μE m⁻²sec⁻¹) / dark cycle. Growth was evaluated by cell counting using a TECAN infinite M1000Pro plate reader and determined following the equation $y = 1.834 \cdot 10^{-08}$

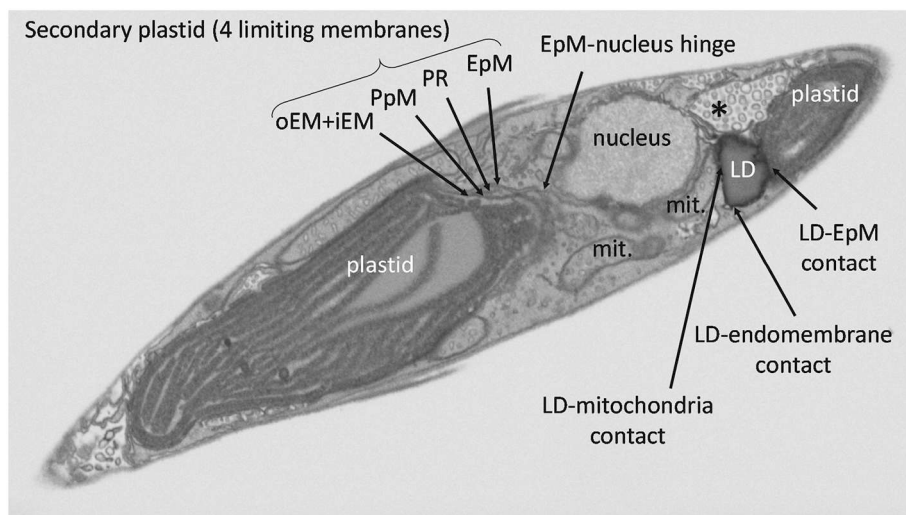


Fig. 1. Interactions of the lipid droplet of *P. tri-cornutum* with other organelles. Cells were collected in late exponential phase (beginning of nitrogen starvation). iEM, chloroplast inner envelope membrane; LD, lipid droplet; mit, mitochondria; PR, periplastid reticulum; PPM, periplastid membrane; oEM, chloroplast outer envelope membrane; EpM, epiplastid membrane; *, an uncharacterized endomembrane compartment differing from the mitochondrion by the absence of an electron-dense matrix and the presence of vesicles inside a membrane sack.

$x + 0.03758$ with x = the absorbance at 730 nm and y = the number of cells [24].

2.2. Evaluation of neutral lipid accumulation by Nile red staining

Accumulation of triacylglycerol droplets was monitored by Nile Red (Sigma Aldrich) fluorescent staining as previously described [14,53]. In brief, cells were diluted and adjusted to a cell density that was linearly correlated with Nile Red fluorescence. Nile Red solution (40 μ L of a 2.5 μ g·mL⁻¹ stock solution in DMSO) was added to 160 μ L cell suspensions. LD stained with Nile Red were then visualized using a Zeiss LSM800 confocal laser scanning microscope equipped with a Zeiss Plan-APO x63-numerical aperture 1.46 oil immersion objective and enlarged x4. Nile Red fluorescence was monitored by excitation at 488 nm and capture zone ranging from 579 nm to 641 nm. Chlorophyll fluorescence was monitored by excitation at 488 nm and by capture zone ranging from 650 nm to 700 nm. Bright field acquisitions were also performed. Acquisition was saved under the Zeiss .czi format and imported with ImageJ 1.48v thanks to the BIO-FORMATS plugins 5.7.2. Alternatively, Nile red fluorescence values were normalized to the cell concentration.

2.3. Purification of lipid droplets

Lipid droplet (LD) purification was carried out in three independent biological replicates, from *P. tri-cornutum* cells cultivated in a 3-L volume (10N10P), up to a cell concentration of 5×10^6 cells·mL⁻¹, then subjected to nitrogen starvation (00N10P) for 7 days. Cells were collected by centrifugation at 6000 \times g, 4 °C for 20 min (JLA 10.500 rotor, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and resuspended using a salt buffer (10 mM Tris-HCl + 2% NaCl). Cells were then collected by an additional centrifugation at 6000 \times g, 4 °C for 20 min and resuspended in 50 mL of a sucrose buffer (sucrose 0.25 M; EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM, final concentration, pH 7.6) supplemented with a protease inhibitor cocktail (cOmplete, Roche Diagnostics). Concentrated cells were broken using a cell disruption systems (Constant Systems Limited, Daventry, UK) set at a 2 kbar rupture pressure. Cell breakage was verified by confocal imaging. Presence of LDs was assessed by Nile red staining as described above. The broken cells were centrifuged at 48,000 \times g (JA 20 Rotor, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), 4 °C for 20 min (SS34 rotor, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) to eliminate the largest cell debris. The supernatant was recovered and adjusted to a concentration of sucrose 1.25 M. A cushion of 4.5 mL of this fraction was loaded at the bottom of an ultracentrifuge tube (SW32ti, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A second layer of 7 mL sucrose 0.7 M; Triton X-100 0.2% v/v; Tris-HCl 10 mM pH 7.6 supplemented with a protease

inhibitor cocktail was added gently above the sample. A third layer of 1.5 mL sucrose 0.25 M; Tris-HCl 10 mM pH 7.6 supplemented with protease inhibitor cocktail was added gently on top of the discontinuous gradient. Gradient was ultracentrifuged at 68,000 \times g, 4 °C for 16 h. LDs were carefully collected at the top of the tubes and transferred into 1.5 mL tubes. LDs were washed two times in Tris-HCl 10 mM, pH 7.6 at 20,000 \times g, 4 °C for 10 min (S55A2 Rotor, Hitachi Koki, Tokyo, Japan). A volume of 6.85 mL of purified LD is obtained per purification. The enrichment in LDs was controlled in an aliquot fraction by confocal imaging, fixed in 3% agarose in Tris-HCl 10 mM pH 7.6 in order to limit LD movements.

2.4. Sample preparation for lipidomic and proteomic analyses

Each sample corresponding to whole cells and purified LDs were divided in fractions for lipidomic, pigment and proteomic analyses, respectively. For lipidomic analyses (glycerolipids, sterols, carotenoids), hydrophobic metabolites were extracted using solvents, either from freeze-dried cells corresponding to a 50 mL aliquot fraction of the nitrogen starved culture used for LD purification or from 850 μ L of purified LD fractions. Whole cell lipids were extracted using the Folch method [54,55]. In brief, freeze-dried cells were suspended in 4 mL of boiling ethanol for 5 min to prevent lipid degradation, and lipids were extracted by addition of 2 mL methanol and 8 mL chloroform at room temperature. The mixture was then saturated with argon and stirred for 1 h at room temperature. After filtration through glass wool, cell debris were rinsed with 3 mL chloroform/methanol 2:1, v/v, and 5 mL of NaCl 1% were added to the filtrate to initiate phase separation. The chloroform phase was dried under argon before solubilizing the lipid extract in 1 mL of chloroform. LD lipids were extracted using the Bligh and Dyer method [14,56]. Extracted lipids were dried under a flow of argon and conserved at -20 °C until analyses. For proteomic analyses, proteins from purified LDs were precipitated overnight at -20 °C in cold acetone. Samples were centrifuged at 20,000 \times g (S55A2 Rotor, Hitachi Koki, Tokyo, Japan), 0 °C for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was incubated at -20 °C in cold ethyl acetate for 2 h to eliminate residual oil. Samples were centrifuged at 20,000 \times g, 0 °C for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was dried under a fume hood to remove traces of ethyl acetate. Three independent purifications were performed, corresponding to biological replicates. For each independent purification, LD proteins were suspended in 100 μ L of a lysis buffer (urea 7 M, thiourea 2 M, 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate (CHAPS) 4% w/v, Triton X-100 3% v/v and SDS 2% w/v). The quantity of purified LD proteins was evaluated on 2 μ L aliquots, loaded onto a SDS PAGE and stained using

the SilverQuest staining kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in comparison with known amounts of proteins from a whole cell fraction resolved in parallel. 8 μL of purified LD proteins were used for proteomic analyses. The remaining fractions (86 μL per independent purification, pooled in 258 μL) were concentrated using Ultracel - 3K filters (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Ireland), and eluted in a final volume of 48 μL , used for further SDS PAGE and Western blot analyses.

2.5. Glycerolipid profiling by liquid chromatography - tandem mass spectrometry

For each whole cell and LD lipid extracts, total glycerolipids were quantified from their fatty acids (FAs): in a 10 μL aliquot fraction a known quantity of saturated 15-carbon FA (15:0) was added and all FAs were methanolized into methyl esters (FAME) by a 1 h incubation in 3 mL 2.5% H_2SO_4 in pure methanol at 100 °C [57]. The reaction was stopped by addition of 3 mL water, and 3 mL hexane was added for phase separation. After 20 min of incubation, the hexane phase was transferred to a new tube. FAMES were extracted a second time via the addition, incubation and extraction of another 3 mL hexane. The combined collected hexane fractions (6 mL) were argon-dried and FAMES were suspended in 40 μL hexane for analysis by gas chromatography coupled with flame ionization detection (GC-FID) (Perkin Elmer), using a BPX70 (SGE) column. FAMES were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma) and quantified by the surface peak method using 15:0 for calibration. Extraction and quantification were performed with three biological replicates. Glycerolipids were then analyzed and quantified by high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), with appropriate standard lipids [58]. In brief, lipid extracts corresponding to 25 nmol of total fatty acids were dissolved in 100 μL of chloroform/methanol [2/1, v/v] containing 125 pmol of each internal standard. Internal standards used were phosphatidylethanolamine (PE) 18:0–18:0 and diacylglycerol (DAG) 18:0–22:6 from Avanti Polar Lipid, and sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) 16:0–18:0 extracted from spinach thylakoid [59] and hydrogenated [60]. Lipids were then separated by HPLC and quantified by MS/MS. Lipid classes were separated using an Agilent 1200 HPLC system using a 150 mm \times 3 mm (length \times internal diameter) 5 μm diol column (Macherey-Nagel), at 40 °C. The mobile phases consisted of hexane/isopropanol/water/1 M ammonium acetate, pH 5.3 [625/350/24/1, v/v] (A) and isopropanol/water/1 M ammonium acetate, pH 5.3 [850/149/1, v/v] (B). The injection volume was 20 μL . After 5 min, the percentage of B was increased linearly from 0 to 100% in 30 min and kept at 100% for 15 min. This elution sequence was followed by a return to 100% A in 5 min and an equilibration for 20 min with 100% A before the next injection, leading to a total runtime of 70 min. The flow rate of the mobile phase was 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. The distinct glycerophospholipid classes were eluted successively as a function of the polar head group. Mass spectrometric analysis was performed on a 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent) equipped with a Jet stream electrospray ion source under following settings: drying gas heater at 260 °C, drying gas flow at 13 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, sheath gas heater at 300 °C, sheath gas flow at 11 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizer pressure at 25 psi, capillary voltage at \pm 5000 V and nozzle voltage at \pm 1000 V. Nitrogen was used as collision gas. The quadrupoles Q1 and Q3 were operated at widest and unit resolution respectively. Phosphatidylcholine (PC) and diacylglycerol hydroxymethyltrimethyl- β -alanine (DGTA) analyses were carried out in positive ion mode by scanning for precursors of m/z 184 and 236 respectively at a collision energy (CE) of 34 and 52 eV. SQDG analysis was carried out in negative ion mode by scanning for precursors of m/z -225 at a CE of -56 eV. Phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylglycerol (PG), monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) measurements were performed in positive ion mode by scanning for neutral losses of 141 Da, 277 Da, 189 Da, 179 Da and 341 Da at

CEs of 20 eV, 12 eV, 16 eV, 8 eV and 8 eV, respectively. DAG and triacylglycerol (TAG) species were identified and quantified by multiple reaction monitoring (MRM) as singly charged ions $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ at a CE of 16 and 22 eV respectively. Quantification was done for each lipid species by multiple reaction monitoring (MRM) with 50 ms dwell time with the various transitions previously recorded [14]. Mass spectra were processed using the MassHunter Workstation software (Agilent) for identification and quantification of lipids. Lipid amounts (pmol) were corrected for response differences between internal standards and endogenous lipids and by comparison with a qualified control (QC). QC extract correspond to a known *P. tricornutum* lipid extract qualified and quantified by thin-layer chromatography and gas-chromatography coupled to ion flame detection as described previously [14].

2.6. Pigment extraction and HPLC analysis

Total pigments were analyzed either from *P. tricornutum* whole cells or from purified LDs. After collection by centrifugation at 11,000 \times g, 4 °C, for 5 min, 1.5×10^8 cells of *P. tricornutum* were resuspended in 100 μL of cold Methanol - Tris-HCl (10 mM pH 7.4). Pigments were extracted under argon, on ice and in the dark. After centrifugation at 11,000 \times g, 4 °C for 5 min, the supernatant was recovered, kept in the dark at 4 °C, and the pellet was further extracted 3 times with methanol 100%, i.e., until the pellet became white. All supernatant fractions were pooled together and dried under argon. Pigments from LDs were collected in the lipid fraction. Pigments from total extracts and LD fractions were resuspended in 100 μL of dimethylformamide before injection on a HPLC (Varian ProStar 800, Walnut Creek, CA, USA) coupled to a diode array detector. The carotenoids were separated on a C18 reverse-phase column (250 \times 4.6 mm) manufactured by Macherey-Nagel using the following method. The initial mobile phase was methanol 80%/ammonium acetate 0.5 M 20%, followed by a linear gradient to 100% of a solvent B consisting of acetonitrile 90%/water 10% during 4 min, in turn followed by a linear gradient to 80% ethyl acetate/20% B up to 20 min, a solvent composition kept for another 5 min. Identification of carotenoids was achieved by comparing retention times and spectral properties acquired on-line with authentic standards (Fucoxanthin, β -carotene, lycopene).

2.7. Sterol analysis

Pure LD lipids were dissolved in 500 μL benzene and stored at -20 °C. Aliquots (1/10 by volume) were used as test samples to evaluate the total ion chromatograms in gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Samples were treated by halves as follows, to determine both esterified and free sterols. Dried extracts were saponified in 300 μL of KOH 6% in MeOH, for 1 h at 70 °C. Water (0.5 volume) was added to the mixture. The non-saponifiable compounds were extracted with three volumes of *n*-hexane. The dried residue was acetylated in toluene (100 μL) in the presence of acetic anhydride (50 μL) and pyridine (40 μL) at 70 °C for 1 h. Reagents were air-dried (warm air stream) then the extract was dissolved in *n*-hexane (100 to 300 μL) in GC vials (with inserts). Alternatively, dried extracts were separated on thin layer chromatography (TLC) plates (Merck 60F₂₅₄) using dichloromethane as a developing solvent. One run of TLC yielded resolved fractions of free sterols at $R_f = 0.14$ and at sterol esters (of fatty acids) at $R_f = 0.86$. Commercial cholesterol and cholesterol oleate were used as TLC standards. Fractions containing free sterols and sterol esters were scrapped off the plate. Sterol esters were saponified as described above. Residues were then acetylated and analyzed by GC-MS. The temperature program of the oven of an Agilent 6890 chromatograph coupled to an Agilent 5973 mass selective detector included a steep ramp from 60 to 220 °C (30 °C \cdot min $^{-1}$) then a 2 °C \cdot min $^{-1}$ ramp from 220 to 300 °C, followed by a 10 min plateau. Compounds were separated on a HP5-MS column (Agilent; 30 m long, 0.32 mm i.d., 0.25 mm film thickness; 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ hydrogen as carrier gas) and

identified by their mass spectra. Brassicasteryl acetate was detected at $R_t = 34.5$ min, its mass spectrum at EI 70 eV [$M^+ - ROH$ 380(100), $M^+ - CH_3 - ROH$ 365(5), $M^+ - SC - ROH$ 255(25)] and retention time was identical to that of an authentic standard. Total brassicasterol acetate in extracts was determined according to a standard curve.

2.8. Proteomic analyses

2.8.1. SDS-PAGE and in-gel trypsin digestion

LD fractions were prepared in biological triplicate. 8 μ L of purified LD proteins adjusted to 25 μ L Laemmli buffer were loaded on top of a SDS-PAGE gel (NuPAGE 4–12%, Invitrogen) and migrated on a 60 mm distance in order to separate potential lipidic front from the protein content. After Coomassie blue staining (R250, Bio-Rad), the gel areas containing proteins were manually excised and cut into 8 bands for in-gel digestion with trypsin using a Freedom EVO150 robotic platform (Tecan Trading AG, Switzerland) as follows. Gel bands were washed six times by successive incubations in NH_4HCO_3 25 mM and then in CH_3CN 50% v/v, NH_4HCO_3 25 mM. After dehydration in pure CH_3CN , reduction was carried out with DTT 10 mM in NH_4HCO_3 25 mM (45 min at 53 °C) and alkylation with iodoacetamide 55 mM in NH_4HCO_3 25 mM (35 min in the dark). Alkylation was stopped by the addition of DTT 10 mM in NH_4HCO_3 25 mM (10-min incubation). Gel pieces were then washed again in NH_4HCO_3 25 mM and dehydrated with pure acetonitrile. Modified trypsin (sequencing grade, Promega) in NH_4HCO_3 25 mM was added to the dehydrated gel pieces for incubation at 37 °C overnight. Peptides were extracted from gel pieces in three sequential extraction steps (each 15 min) in 30 μ L of CH_3CN 50% v/v, 30 μ L of formic acid 5% v/v, and finally 30 μ L of pure CH_3CN . The pooled supernatants were dried under vacuum.

2.8.2. Analysis of trypsin peptides by nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS)

The dried extracted peptides were resuspended in acetonitrile 5%, trifluoroacetic acid 0.1% and analyzed via online nano-LC-MS/MS (nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry; NCS and Q-Ex HF, Thermo Fischer Scientific). Peptide mixtures were desalted on line using a reverse phase precolumn (Reprosil PUR C18 AQ 1.9 μ m, 250 mm \times 75 μ m; Cluzeau) and resolved on a C18 column (Acclaim PepMap 100 C18, 3 μ m bead size, 100 Å pore size, 250 mm \times 75 μ m, Dionex). Peptides were separated using 140-min gradients ranging from 4% to 50% acetonitrile in formic acid 0.1% in 123 min and wash to 90% and equilibration at 4% at a flow rate of 300 nL·min⁻¹. MS (mass spectrometry) and MS/MS data were acquired using the Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific). The spray voltage was set at 2 kV and the heated capillary was adjusted to 270 °C. Survey full-scan MS spectra ($m/z = 400$ –1600) were obtained in the Orbitrap with a resolution of 60,000 after accumulation of 1.10^6 ions (maximum filling time: 200 ms). The 20 most intense ions from the preview survey scan delivered by the Orbitrap were fragmented via collision-induced dissociation in the LTQ after accumulation of 1^{e5} ions (maximum filling time: 50 ms). Raw files were processed using MaxQuant version 1.5.8.3 [61].

2.8.3. Protein determination

Mass spectrometry spectra were searched against a compilation of the *P. tricornutum* protein database from the Ensembl Protists portal (Phaeodactylum_tricornutum.ASM15095v2.pep.all.fasta, 12,178 entries), the organellar-encoded proteins (165 entries) and the frequently observed contaminant database embedded in MaxQuant. Trypsin/P was chosen as the enzyme and 2 missed cleavages were allowed. Precursor mass error tolerances were set respectively at 20 ppm and 4.5 ppm for first and main searches. Fragment mass error tolerance was set to 20 ppm. Peptide modifications allowed during the search were: carbamidomethylation (C, fixed), acetyl (Protein N-ter, variable), and oxidation (M, variable). Minimum peptide length was set to 7 amino acids.

Minimum number of peptides, razor + unique peptides and unique peptides were all set to 1. Maximum false discovery rates, calculated by employing a reverse database strategy, were set to 0.01 at peptide and protein levels. For quantification, the “Match between runs” option was activated. To evaluate the relative abundance of each protein in the LDs preparations, proteins were quantified using iBAQ [62]. Proteins that failed to be quantified in all three replicates were discarded. iBAQ values were normalized to the sum of all intensities within each replicate. Proteins were ranked according to the sum of normalized iBAQ (decreasing order) thus including missing values with iBAQ = 0. For annotations: descriptions of the proteins were obtained from the Ensembl fasta file. This functional annotation was completed by expert annotations obtained from the corresponding gene version at JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/Phatr2> and https://genome.jgi.doe.gov/Phatr2_bd), based on the search for signal peptides, using the SignalP predictive method [63], chloroplast transit peptides, based on the ChloroP predictive method [64] and on the detection of an ASAFAP-motif specific to sequence import into secondary plastids [65]. Prediction of transmembrane helices in proteins was performed at the TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) [66] and isoelectric point (IP) values were predicted using the Avg_Pi output of the standalone IPC Isoelectric Point Calculator program (<http://isoelectric.ovh.org/>) [67].

2.9. Western blot analyses

Immunodetection of organellar protein markers was performed on protein extracts from whole cells of *P. tricornutum* grown in nitrogen-rich and nitrogen-depleted media and from purified LD fractions. For whole cell extracts, 200 mL of *P. tricornutum* cells were either cultivated 7 days in 10N10P ESAW medium up to a cell concentration of 8×10^6 cells·mL⁻¹ or incubated 7 days in 00N10P ESAW medium, after a 10-day growth in rich medium, up to a cell concentration of 9.10^6 cells·mL⁻¹. Cells were collected by centrifugation at 4000 \times g, 4 °C for 7 min (Rotor A-4-44, Eppendorf). Pellets were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Pellets were lyophilized and phenol extracted as described previously [68] with the addition of EDTA 50 mM, β -mercaptoethanol 2% v/v, PMSF 2 mM, and cOmplete protease inhibitor cocktail as specified by the supplier (Roche Diagnostics). A total of 15 μ g of proteins from whole cell extracts and of 2 μ g proteins from LDs were then resolved by SDS-PAGE on a 12% acrylamide gel before transfer to a nitrocellulose membrane. Immunodetection was performed by peroxidase-coupled detection (Clarity western ECL Substrate, Biorad). Antibodies against StLDP, Seipin, CNX, COP1, PEX3, ACL1, CGI-58, RAE1 and TPT1 were obtained by rabbit immunization (Biotem). Antibodies were affinity purified on the peptides. The purity of LD fraction was also checked with commercial antibody (Agriser): Sec21p (AS08 327), PsaC (AS10 939), PsaA (AS05 084) and ATP β mitochondrial and chloroplastic (AS05 085). All the antibodies were used at a dilution of 1/1000 with the exception of CNX at 1/5000 and ATP β at 1/2000.

2.10. Transmission electron microscopy

For whole cell imaging, cells of *P. tricornutum* were harvested at late logarithmic phase (2×10^6 cells·mL⁻¹) before the offset of the light period, by centrifugation at 5000 \times g, 4 °C for 10 min. Cells were then fixed in glutaraldehyde 2.5% (TAAB); formaldehyde 2% (Polysciences); cacodylate 0.1 M (Sigma-Aldrich), pH 7.4, for 1 h at room temperature. Electron microscopy observation was performed using a Zeiss NVision 40 dual-beam microscope as described previously [47,69]. For lipid droplet imaging, diluted suspensions of purified fractions were deposited onto glow-discharged carbon-coated TEM grids. After a few minutes, the liquid in excess was blotted with filter paper and, prior to drying, the preparation was negatively stained with 2% uranyl acetate. The stain in excess was blotted and the specimen was allowed to dry.

Images were recorded with a Philips-FEI CM200 microscope operating at 200 kV and equipped with a TVIPS TemCam F216 digital camera.

2.11. Statistical analysis

All the analytical determinations were performed in biological triplicate. Statistical analyses were achieved using GraphPad prism software (GraphPad software Inc., CA, USA). One-way and two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test was carrying out. The difference between groups was considered significant when the *p*-value was equal to or < 0.05.

2.12. Accession numbers

Phatr3_draftJ1735; Phatr3_draftJ977; Phatr3_EG00979;
Phatr3_EG01955; Phatr3_EG01984; Phatr3_EG02298; Phatr3_EG02301;
Phatr3_EG02323; Phatr3_EG02389; Phatr3_EG02643; Phatr3_J13587;
Phatr3_J13662; Phatr3_J13951; Phatr3_J14618; Phatr3_J14792;
Phatr3_J15138; Phatr3_J15806; Phatr3_J17545; Phatr3_J1884;
Phatr3_J20657; Phatr3_J20885; Phatr3_J21122; Phatr3_J21239;
Phatr3_J21929; Phatr3_J22006; Phatr3_J22122; Phatr3_J22357;
Phatr3_J22395; Phatr3_J22873; Phatr3_J24820; Phatr3_J24978;
Phatr3_J25743; Phatr3_J26290; Phatr3_J26921; Phatr3_J27118;
Phatr3_J27518; Phatr3_J27976; Phatr3_J28737; Phatr3_J29260;
Phatr3_J29702; Phatr3_J30315; Phatr3_J30486; Phatr3_J30519;
Phatr3_J30660; Phatr3_J34971; Phatr3_J35766; Phatr3_J40880;
Phatr3_J41856; Phatr3_J42434; Phatr3_J44488; Phatr3_J45510;
Phatr3_J45679; Phatr3_J45813; Phatr3_J46098; Phatr3_J46448;
Phatr3_J48778; Phatr3_J48859; Phatr3_J49286; Phatr3_J49287;
Phatr3_J4937; Phatr3_J49943; Phatr3_J50214; Phatr3_J50215;
Phatr3_J50236; Phatr3_J50705; Phatr3_J50872; Phatr3_J51058;
Phatr3_J51066; Phatr3_J51128; Phatr3_J51157; Phatr3_J51230;
Phatr3_J51305; Phatr3_J54019; Phatr3_J54086; Phatr3_J54360;
Phatr3_J54534; Phatr3_J54642; Phatr3_J54686; Phatr3_J55010;
Phatr3_J55230; Phatr3_J6847.

3. Results

3.1. Lipid droplet purification

LDs were purified from *P. tricornutum* wild-type cells (CCMP632/CCAP 1055/1; Pt1) cultivated in 3-liter batches in a rich medium (ESAW 10N10P) and subjected to a starvation in nitrogen (ESAW 00N10P) during seven days (Fig. 2, A1). Nitrogen starvation triggered the accumulation of LD within cells (Fig. 2, B1). We first sought to optimize the LD purification procedure previously described [49] so as to avoid contaminations by cellular debris. Cells were broken gently using a cell disruptor set at a pressure of 2 kbar. In confocal microscopy, Nile red-stained LDs appeared mixed with cell debris, including broken chloroplasts, assessed by chlorophyll fluorescence (Fig. 2A2 and B2). We then repeated the purification procedure described previously [49], by adjusting the sucrose concentration of the broken cells to 0.25 M, loading this sample on top of a 0.7 M sucrose cushion and proceeding with an ultracentrifugation at 50,000 ×g for 20 min at 4 °C. The SDS PAGE analysis of the obtained fraction showed a profile similar to that described by Yoneda et al. (2016). Nevertheless, LD collected at the upper surface of the tubes were not totally separated from lower density cell debris, as lipidomic profile indicated a strong contamination by MGDG and proteomic analyses returned > 1800 proteins in this fraction (data not shown). We sought therefore to improve this purification method, by loading the broken cell sample at the bottom of the density gradient [70,71]. We adjusted the sucrose concentration to 1.25 M, and loaded this sample (4.5 mL) under a discontinuous gradient made of 0.7 M (7 mL) and 0.25 M sucrose (1.5 mL) layers (Fig. 2A3). The fractionation was then achieved based on the buoyancy of low-density LDs. The 0.7 M layer also contained Triton-X100 so as to wash the surface of

LDs, while moving toward the upper surface of the discontinuous gradient. After a 16-hour ultracentrifugation at 68,000 ×g at 4 °C, LDs were collected at the surface of the tubes, clearly separated from higher density debris (Fig. 2A3). LD enrichment was monitored after cell disruption and after ultracentrifugation by confocal microscopy, based on Nile red staining (Fig. 2B3). Electron microscopy negative staining of purified LDs showed exclusively spherical structures with diameters of ~100–300 nm (Fig. 2C). This LD purification procedure was therefore used for three independent replicates and obtained LD fractions were used for further analyses.

3.2. Glycerolipidome of *P. tricornutum* lipid droplets

The glycerolipid composition of purified LDs was compared to the whole-cell glycerolipidome determined from *P. tricornutum* grown in nitrogen starvation (Fig. 3). Starved cells contained about 27 mol% of TAG, consistently with previous works [14,17]. Most abundant polar lipids were three plastid glycolipids, i.e. monogalactosyldiacylglycerol (MGDG, 43.8 mol%), digalactosyldiacylglycerol (DGDG, 11.7 mol%) and sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG, 7.3 mol%). Phosphatidylcholine (PC, 5.5 mol%) and the betaine lipid diacylglycerolhydroxymethyl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanine (DGTA, 1.1 mol%) usually synthesized in the ER, were less abundant (Fig. 3A). The fraction of purified LDs contained 99.0% of TAG. MGDG represented < 0.05 mol% of LD lipids, confirming the high purity of the obtained fraction (Fig. 3A). No diacylglycerol could be detected in LDs (Fig. 3A) and the profile of TAG molecular species in the purified fraction was identical to that in whole cells (Fig. 3B), indicating that the integrity of LDs was not affected by lipases after cell breakage and separation on density gradient.

We detected DGTA (0.4 mol%), SQDG (0.35 mol%) and PC (0.15 mol%) in the LD (Fig. 3A). LDs contained nearly exclusively DGTA with eicosapentaenoic acid (C20:5) paired with palmitoleic or palmitolenic acids (C16:1 or C16:2), whereas whole cell DGTA contained also C16:0, all the C18:1, C18:2, C18:3 and C20:4 precursors of C20:5, as well as docosahexaenoic acid, C22:6 (Fig. 3C and D). PC and SQDG occurring in LD fractions had no significant difference in their fatty acid profiles compared to whole cell extracts (Fig. 3E and F). Whereas the presence of < 0.05% of the major plastid lipid, MGDG, indicated a remarkably low contamination by broken chloroplasts, the presence of SQDG indicates that this plastid lipid was specifically enriched at the surface of the LD.

3.3. A unique sterol in *P. tricornutum* lipid droplets, brassicasterol

Two major sterols have been previously identified in whole cells of *P. tricornutum*, i.e. brassicasterol (24-methylcholest-5,22-dien-3 β -ol) and campesterol (24-methylcholest-5-en-3 β -ol), with structures confirmed by mass spectrometry [72,73]. Brassicasterol and campesterol are structurally similar to cholesterol, containing 4 strongly hydrophobic hydrocarbon rings, a hydroxyl group at the 3-carbon atom of the A-ring and a short alkyl tail: these molecules display therefore amphipathic properties [74]. Here, we clearly identified one single molecular species, brassicasterol, in whole cells extracts and in purified LD fractions (Supplemental Fig. S1), representing < 5 mol% of total sterols + glycerolipids. Structure was assessed by mass spectrometry based on the identification of brassicasteryl specific fragments with *m/z* of 255.2 [M⁺-SC-ROH], 365.0 [3M⁺-CH3-ROH] and 380.4 [M⁺-ROH]. Remarkably, we could not detect any brassicasterol ester but only free brassicasterol as a pathway end-product. This low proportion of such an amphipathic lipid indicates that it is located close to, or inside the lipid monolayer at the surface of the LD and not in the hydrophobic core [75,76].

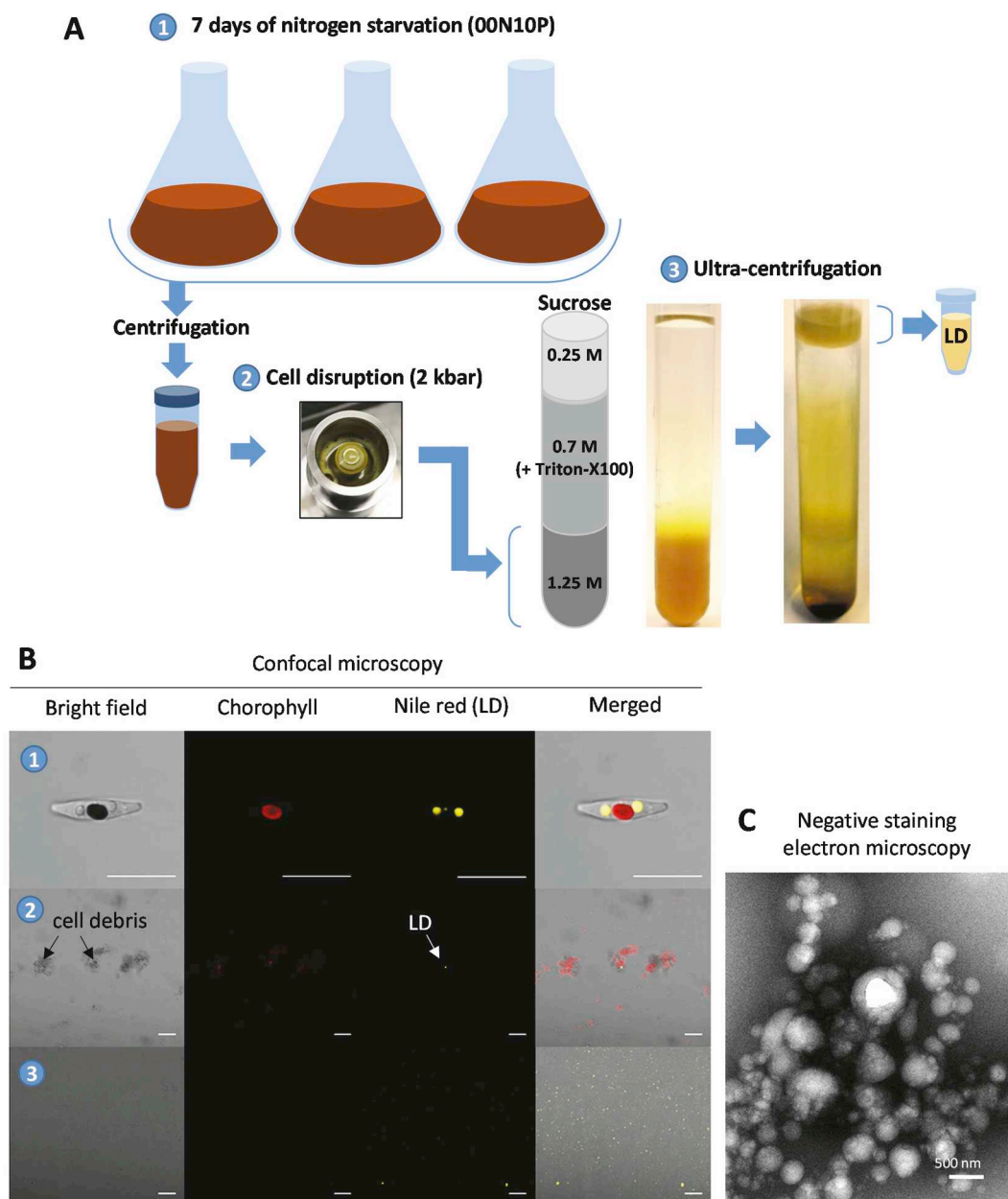


Fig. 2. LD purification from nitrogen-starved *P. tricornutum* cells. **A.** Main steps of the LD purification protocol. *P. tricornutum* cells starved for 7 days in a medium without nitrogen (ESAW 00N10P) (step 1). Cells were collected by centrifugation and broken by high pressure (step 2). The purification was carried out by adjusting the sucrose content of the broken cells to 1.25 M prior loading 4.5 mL at the bottom of a density gradient. A 7-mL layer containing 0.7 M sucrose and triton X-100 was added, so as to allow lower density organelles to be separated based on buoyancy, while weakly associated structures and proteins were washed away by the detergent. A 1.5-mL layer containing 0.25 M sucrose was then added at the top of the tube for LD complete purification. The tubes were centrifuged at 68,000 \times g, 4 °C for 16 h and purified LDs were collected at the top of the gradients (step 3). **B.** Monitoring of LD enrichment by confocal imaging. Scale bars: 10 μ m. **C.** Purified LDs observed by negative staining electron microscopy. Scale bar: 500 nm. Purified LDs were analyzed from three independent biological replicates.

3.4. Specific enrichment of lipid droplets in β -carotene

Purified LDs floating at the surface of the density gradient had a pale yellow color, whereas dense cell debris, at the bottom of the tube, were brown (Fig. 2A). We addressed the possible accumulation of pigmented carotenoids within LDs. Fucoxanthin is one of the main pigments in *P. tricornutum*, cultivated in either rich or nitrogen depleted condition [77]. In the present cultivation conditions in nitrogen rich (ESAW 10N10P) and nitrogen depleted (ESAW 00N10P) media, fucoxanthin represents > 40 mol% of total carotenoid and chlorophyll pigments (Fig. 4). In purified LDs, the same proportion of fucoxanthin was

measured (Fig. 4), suggesting that a nonspecific enrichment of this hydrophobic molecule might have occurred in the course of LD purification. However, whereas whole cells also contained high levels of diadinoxanthin, chlorophyllide *a* and chlorophylls *a* and *c*, only traces of these pigments could be detected in the LD enriched fraction, further supporting the high purity level of the obtained fraction. By contrast, LDs were strongly enriched in β -carotene representing 28.7 mol% of total LD pigments (Fig. 4). Since this carotenoid is extremely minor at the whole cell level, it appears as a specific component of the LD enriched fraction of *P. tricornutum*.

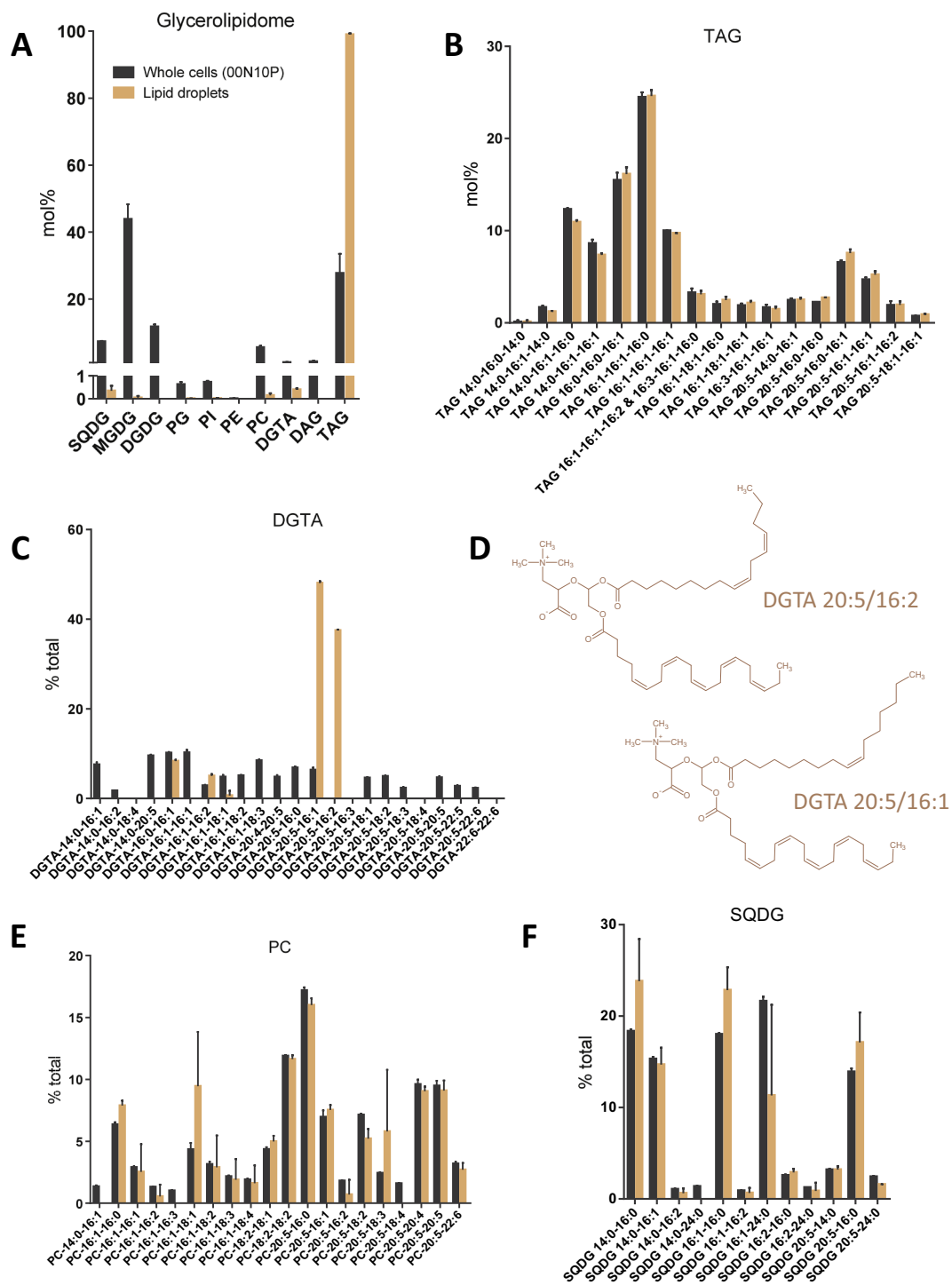


Fig. 3. Glycerolipids in *P. tricornutum* lipid droplets. Glycerolipids were extracted from whole cells cultivated in nitrogen starved medium (00N10P) and from lipid droplet (LD) purified fraction. A, Glycerolipid proportions in whole cells and purified LDs. B, TAG acyl profiles. C, DGTA acyl profiles. D, Chemical structures of the two major molecular species of DGTA in purified LDs. E, PC acyl profiles. F, SQDG acyl profiles. Glycerolipids and molecular species are expressed in mol%. Data correspond to biological triplicates ± standard deviation. DGDG, digalactosyldiacylglycerol; DGTA, 1,2-diacylglyceryl-3-O-2'-(hydroxymethyl)-(N,N,N-trimethyl)-β-alanine; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol. Data obtained from whole cell extracts after cultivation in nitrogen depleted condition (00N10P) and from purified LDs are shown in black and orange, respectively.

3.5. Analysis of the lipid droplet protein fractions using organelle-specific antibodies

Cross contaminations and association of subcellular organelles with purified LDs are not easy to evaluate in *P. tricornutum* samples because specific antibodies are not readily available. We have therefore

developed a series of eight antibodies directed against protein markers of *P. tricornutum* cell compartments. Antigenic peptides were selected in the sequences of the Stramenopile Lipid Droplet Protein (StLDP, Phatr3_J48859) [49], a SEIPIN known to act in the initial budding of nascent LDs (SEIPIN, Phatr3_J47296) [78], a calnexin located at the ER (CNX, Phatr3_J41172), the alpha subunit of the coatomer, known to act

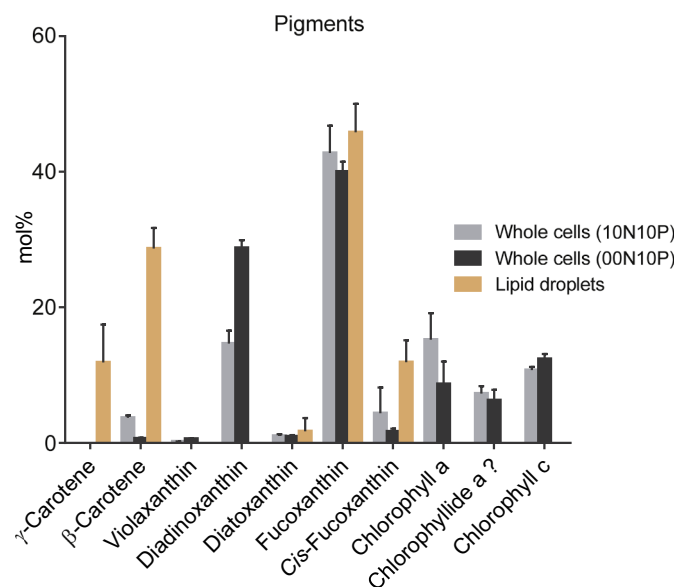


Fig. 4. Carotenoids in *P. tricornutum* lipid droplets. Carotenoids and chlorophylls from whole cells and purified LDs were extracted and analyzed as described in the Methods section. Pigments from whole cells cultivated in nutrient rich condition (10N10P), nitrogen starved condition (00N10P) and in purified LDs are shown in grey, black and orange, respectively. All pigments were determined by comparison with standard molecules. Error bars, standard deviation; $n = 3$.

in vesicular trafficking and to bind LDs in various systems [28] (COPA or COPI1, Phatr3_J21929), the CGI-58 protein, located at the LD in mammals and at the peroxisome in plants [79–81] (CGI-58, Phatr3_J54974), a peroxisomal biogenesis factor (PEX3, Phatr3_J50623), an acyl-coA ligase 1 predicted to locate at the peroxisome (ACL1, Phatr3_J17720), a mRNA export factor binding at the nuclear pores (RAE1, Phatr3_J24439) and an isoform of triose phosphate transporter located at the outermost epiplastid membrane, EpM (see Fig. 1) [82] (TPT1, Phatr3_J50742). We also used commercial antibodies raised against the gamma subunit of the coatomer, (Sec21p; Phatr3_J10209), plastid proteins, i.e. the D1 subunit of photosystem II (PsbA; Q5D706), an iron-sulfur protein of photosystem I (PsaC; PsaC_phatc), and eventually the beta subunit of the mitochondria ATP-synthase (ATPβ chloroplastic and mitochondrial).

The yield in LDs following the procedure detailed here coupled with the protein extraction procedure used to eliminate TAG before SDS-PAGE, did not allow conventional protein quantification for the prepared samples; we therefore proceeded to an evaluation of the amount of proteins based on silver nitrate staining after SDS-PAGE separation (Fig. 5A). A known amount of *P. tricornutum* whole cell proteins (1.5 μg), obtained after cultivation in ESAW 10N10P or ESAW 00N10P media, was loaded in parallel with 2 μL of concentrated LD proteins, allowing to estimate a concentration of ~33 ng of LD proteins per μL. For Western blot analyses, we used 15 μg of whole cell proteins in parallel with 2 μg of concentrated LD proteins (Fig. 5B). We observed an increase in StLDP abundance in whole cell extracts when cells were grown in nitrogen starvation and we detected StLDP in the purified LD fraction (Fig. 5B). The antibody raised against the SEIPIN protein, acting early in the biogenesis of the LD, did not react with the purified LD fraction, suggesting that this protein was not associated with the mature LDs. For all other immunodetections, only CNX known to locate at the ER did react with the proteins extracted from purified LDs. Antibodies targeting the plastid envelope membrane, plastid thylakoids, peroxisome, mitochondria and the nuclear envelope did not react with the proteins extracted from purified LDs (Fig. 5B). In the specific case of RAE1, the protein was detected in whole cells grown in nutrient replete condition, but not upon nitrogen starvation, so the absence of reaction

of the anti-RAE1 antibody with LD proteins might simply reflect the absence of the antigenic protein. Altogether, these analyses support a high level of purity of obtained LDs. The purification procedure including the floatation through a gradient containing Triton-X100 has therefore washed the surface of LDs of possible contaminants. A loss of components bridging the LD to other organelles, such as the ER, the EpM, the mitochondria and/or the peroxisome cannot be excluded.

3.6. Mass spectrometry-based characterization and bioinformatic analysis of the lipid droplet proteome

Proteomic analyses of LD enriched fractions were performed using three independent biological replicates (samples named LD1, LD2 and LD3). For this, proteins were in-gel digested using trypsin before analysis of the resulting peptides using nano-LC-MS/MS. Obtained spectra were identified through searches against a compilation of sequences of the *P. tricornutum* protein database from the Ensembl Protists portal (12,178 entries) and the organellar-encoded proteins (165 entries). This strategy allowed to identify 326 different proteins in total (Supplemental Table S1). In order to build up a reference proteome of LDs from *P. tricornutum*, we set up stringency filters. We first decided to only take into account proteins highly confidently identified with a minimum of 3 peptides, selecting a sublist of 92 proteins (Fig. 6).

In order to select proteins associated with the LD specifically induced by nitrogen starvation, we applied a second filter based on proteins accumulating in whole cell extracts following a depletion of nitrogen. For this, we took advantage of results from another quantitative proteomic analysis of *P. tricornutum* whole cells, cultivated in rich (ESAW 10N10P) and nitrogen depleted (ESAW 00N10P) conditions (data not shown). We discarded from the list of LDs proteins six proteins found to be downregulated in the total proteome of nitrogen-depleted cells (Phatr3_EG01907, Phatr3_J55209, Phatr3_draftJ1806, Phatr3_J54477, Phatr3_J49151 and gi|118411023|ref|YP_874418.1| corresponding to the RUBISCO large subunit).

The LD proteome of *P. tricornutum* is presented in Table 1. First of all, we identified three of the five major proteins identified in the first proteomic study performed on *P. tricornutum* LD [49]: the Stramenopile Lipid Droplet Protein (StLDP, Phatr3_J48859) that was confirmed to localize at its surface [51], the Lipid droplet acyl CoA binding protein (LD-ACBD, Phatr3_J48778) and a Heat shock protein (HSP70A, Phatr3_J54019).

The proteome revealed the presence of proteins belonging to the PAP (Plastid lipid associated protein)/Fibrillin family. This family of proteins is found on the surface of plastoglobules [83,84], a category of lipid bodies generated inside chloroplasts [85]. The generation of TAG-rich lipid droplets inside chloroplasts has been proposed [86], but was recently shown as very unlikely [87]. The detection of these proteins suggests therefore that a minor fraction of plastoglobules were recovered during the purification of cytosolic LDs.

Interestingly, none of the enzymes involved in TAG assembly, such as DGAT or PDAT, or in early biogenesis of the LD, such as SEIPIN, were present in the mature LD proteome. We did neither detect enzymes involved in massive hydrolysis of TAG, such as lipases, or CGI-58 known to be involved in lipogenesis in mammals and plants. The proteomic profile we obtained reflected therefore a rather stable and mature organelle. We classified the functional annotations of the 86 proteins in seven large groups: metabolism (19 proteins), membrane organelles (9 proteins), chaperones, protein folding, posttranslational modifications, quality control (12 proteins), cytoskeleton (3 proteins), genetic information processing (15 proteins), plastoglobules and thylakoid components (18 proteins) and unknown proteins (10 proteins) (Table 1).

Metabolic enzymes enriched in the LD purified fraction involved mainly cytosolic enzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways, and mitochondrial components of the Krebs cycle (Table 1). The plastid carbonic anhydrase (Phatr3_J22357) and acetyl-CoA

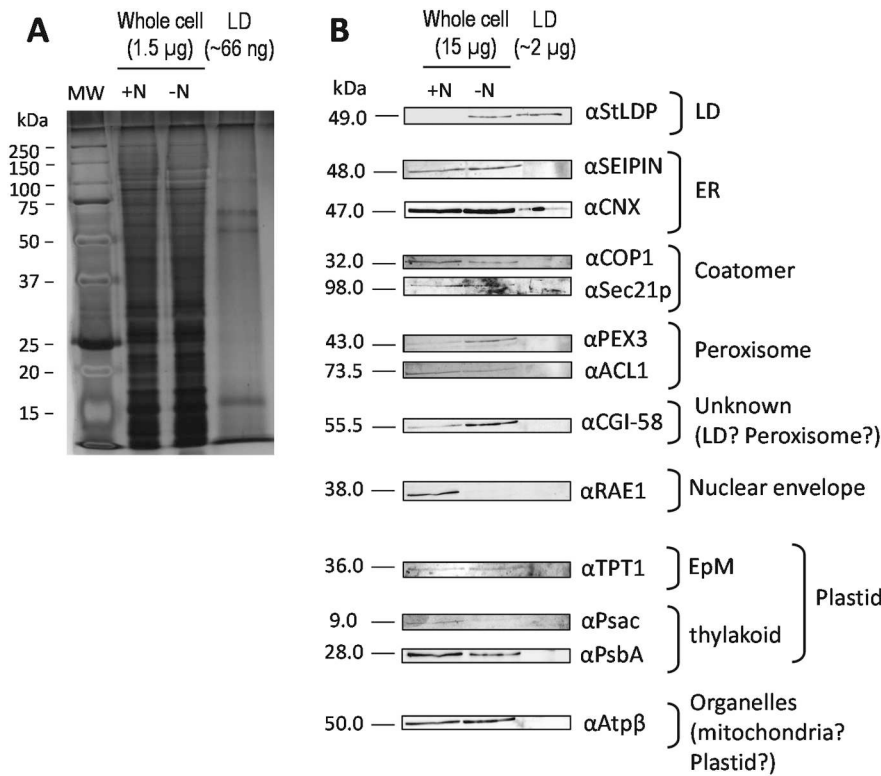


Fig. 5. Western blot analysis of the LD purified fraction. A, Silver nitrate staining of whole cell and lipid droplet protein extracts. A known amount of *P. tricornutum* whole cell proteins (1.5 µg), obtained after cultivation in ESAW 10N10P (+N) or ESAW 00N10P (-N) media, was loaded in parallel with 2 µL of concentrated LD proteins. The amount of protein in the purified fraction of LDs was evaluated by comparison at ~33 ng·µL⁻¹. MW, Molecular Weight. B, Western-blot analysis of LD protein fraction using antibodies raised against membrane compartment markers. The purity of the LD purification was checked by using antibodies raised against different cell compartment markers: StLDP (LD), Seipin (ER), CNX (ER), COP1 and Sec21p (coatomer), PEX3 and ACL1 (Peroxisome), CGI-58 (unknown localization in *P. tricornutum*), RAE1 (Nuclear envelope), TPT1 (Plastid - EpM), PsbA (Plastid - thylakoid) and ATPβ (mitochondria and plastid). All antibodies were used at a dilution of 1/1000 except anti-CN X (αCNX) at 1/5000 and anti-ATPβ (αATPβ) at 1/2000.

carboxylase (Phatr3_EG019955) indicate proximity of LDs with the initiation of fatty acid biosynthesis. Enzymes involved in the catabolism of amino acids, reallocating carbon toward lipids, were detected, i.e. a glutamine synthase (GS, Phatr3_J22357), glutamate dehydrogenase (GDH, Phatr3_J13951); agmatinase (AGMAT, Phatr3_J40880) and urease (UREC, Phatr3_J29702). Two important proteins involved in acyl-CoA metabolism were also found associated to LDs, i.e. a long chain acyl-CoA synthetase (ACS4, Phatr3_J45510) and the LD-ACBD. The presence of plastid- and mitochondria-located enzymes suggests the presence of contact sites with these organelles.

LD contact with other organelles is supported by the detection of membrane proteins, mainly from endomembranes, such as two subunits of the COP1 coatomer (COPA; Phatr3_J21929; COPBETA2, Phatr3_J27518), two components of the clathrin vesicle coating system (CHC, Phatr3_EG01984; PTAP1/2BETA, Phatr3_draftJ1735), a V-ATPase (VATPase, Phatr3_J51058) and a subunit of an ABC transporter (Phatr3_EG02323). Contact with mitochondrial envelope is supported by the detection of an adenine nucleotide translocator at the inner mitochondrial envelope membrane (SLC25A4, Phatr3_J22873).

Membrane proteins from the plastid, more precisely the EpM, were not identified, but it is not excluded that some of the unknown proteins listed here might be located at the EpM. Consistently with this hypothetical localization, 5 of the unknown proteins exhibit a putative signal peptide (Phatr3_J44488, Phatr3_J50215, Phatr3_J49286, Phatr3_J50214, Phatr3_EG02301) based on the SignalP predictive method [63], one containing 3 transmembrane domains (Phatr3_EG02301). One of the unknown proteins is predicted to contain a chloroplast transit peptide (Phatr3_J55010) based on the ChloroP predictive method [64] and on the detection of an ASAFAP-motif specific to sequence import into secondary plastids [65].

LD fraction was enriched in chaperones and components of ubiquitin-regulated machineries controlling protein folding (Table 1). The translation of mRNA into proteins at the periphery of LDs appears therefore facilitated, and is further supported by the presence of 40S and 60S ribosomal subunits and three components of RNA translation machinery, i.e. Elongation factors 1-alpha and 2 (EF1A, Phatr3_J28737; EF2, Phatr3_J35766) and the Eukaryotic translation initiation factor 4A (EIF4A, Phatr3_J25743). Ribosomes are often considered as non-

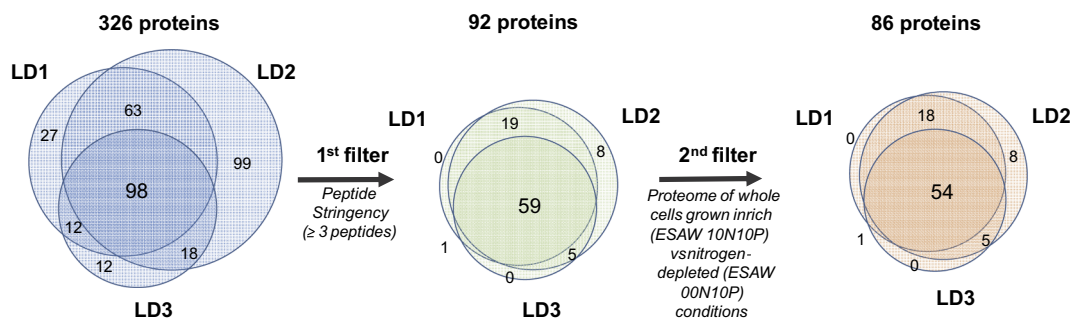


Fig. 6. Characterization of *P. tricornutum* LD core proteome. Proteomic analysis led to the identification of 326 proteins from three independent biological replicates of LD fractions from *P. tricornutum*. To build a reference LD proteome, 2 different filters were then applied. The first one led to the conservation of proteins identified with at least three tryptic peptides. The second filter corresponds to a subtraction of proteins detected in whole cells downregulated in nitrogen-starved condition (ESAW 0N10P) compared to nitrogen-rich condition (ESAW 10N10P). Six proteins were removed from the proteome of purified LDs.

Table 1
 Proteome of the purified LD from *Phaeodactylum tricornutum*. Protein IDs were obtained from the Ensembl database, and when available, Uniprot accessions were provided. Number of trypsin peptides, sequence coverage, sequence length and the number of predicted transmembrane domains (TM) are indicated. (*) localization based on [147].

Functional classification	Protein ID	Gene symbol	Description	Num. of pept	Seq. cover.	MW (kDa)	Seq. length	Score	Uniprot accession	Num. of TM	Localization
Fatty acids synthesis	Phatr3_EG01955	ACC1	Acetyl-CoA carboxylase 1	8	4.3	228.8	2082	68.877	B7G7S4	0	Plastid
	Phatr3_J45510	ACS4	Long chain acyl-CoA synthetase 4	8	14.7	73.186	667	76.902	B7FXX6	0	Cytosol
	Phatr3_J48778	LD-ACBD	Lipid droplet acyl CoA binding protein (Yoneda et al., 2016)	3	13.7	38.326	351	72.793	B7G8C2	4	Cytosol/lipid droplet
Glycolysis	Phatr3_J51128	GAPC2A	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4	14.4	35.418	334	323.31	B7G6K6	0	Cytosol
	Phatr3_J22122	GAPC1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7	24.3	40.182	379	50.257	B7G5Q1	0	Cytosol
Pentose phosphate pathway	Phatr3_J14792	PGK	Phosphoglycerate kinase	4	12.2	45.979	436	33.992	B7G6H0	0	Cytosol
	Phatr3_EG02298	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase	3	2.3	125.38	1119	18.835		0	Cytosol
	Phatr3_J41856	TKL	Transketolase	4	5.2	77.135	711	48.093	B7FUU0	0	Cytosol
	Phatr3_J29260	TKL	Transketolase	3	4.8	74.096	684	26.285	B7GSR3	0	Cytosol
	Phatr3_J27976	PTPEPC2	phosphoenolpyruvate carboxylase	6	6.6	111.88	1009	40.083	B7G1G6	0	Mitochondria*
Oxaloacetate biosynthesis	Phatr3_J30519	PYCI	Precursor of pyruvate carboxylase	3	3.3	136.07	1252	24.278	B7GBG1	0	Mitochondria
	Phatr3_J26921	SCSBETA	Beta chain succinyl-coa synthetase	3	8.6	47.621	443	22.113	B7FXA2	0	Mitochondria
	Phatr3_J26290	ACO2	Aconitase hydratase 2	3	3.4	106.67	989	31.174	B7FUR4	0	Mitochondria
	Phatr3_J51305	CA	Carbamic anhydrase	9	34.4	31.064	282	323.31	B7FNU0	0	Plastid
CO ₂ concentration	Phatr3_J1305	CA	Carbamic anhydrase	9	34.4	31.064	282	323.31	B7FNU0	0	Plastid
	Phatr3_J22357	GS	Glutamine synthase	7	11.3	79.635	716	58.012	B7G6Q6	0	Cytosol
Glutamate catabolism	Phatr3_J13951	GDH	Glutamate dehydrogenase	3	8.2	49.458	450	19.966	B7G3X3	0	Cytosol
	Phatr3_J40880	AGMAT	Agmatinase	3	7.5	45.336	416	19.901	B7GCN5	0	Mitochondria
Ornithine-Urea cycle	Phatr3_J29702	UREC	Urease	3	4	94.032	878	19.026	B7G7W5	0	Cytosol
	Phatr3_J20885	GST	Glutathione S-transferase	3	11.7	34.621	307	18.389	B7G1M7	0	Mitochondria
Oxydoreduction	Phatr3_J48859	SLDP	Stramenopile Lipid droplet protein (Yoneda et al., 2016)	4	12.3	48.904	456	35.866	B7G8M1	2	Lipid droplet
	Phatr3_J13662	TM9SF	Nonaspanin	3	5.4	71.73	626	66.771	B7G2V6	9	Golgi/endosome
Unknown function, ER and plasma membrane	Phatr3_J21929	COPI/COPA	Coatomer subunit alpha	6	6	137.77	1254	89.602	B7G4Z7	0	TGN, ER, Lipid droplet?
	Phatr3_J27518	COPI/COPB2	Coatomer, WD associated region	3	4.9	105.92	962	28.833	B7FZS9	0	TGN, ER, Lipid droplet?
Coatomer	Phatr3_EG01984	CHC	Clathrin heavy chain	8	6.2	188.26	1672	121.18	B7G4Y3	0	Endocytic vesicles
	Phatr3_draftJ1735	PTAP1/2BETA	Beta subunit of clathrin adaptor complex AP2	5	6.7	98.631	890	58.116	B7S4C6	0	Plasma membrane
Clathrin vesicle Formation	Phatr3_J51058	VATPase	V-type H-ATPase subunit	3	13.7	27.891	255	29.119	B7G360	0	Endosome
	Phatr3_EG02323	ABC	ABC-transporter like protein, partial	7	4.3	253.01	2256	110.97	B7G0T6	1	Plasma membrane
Inner mitochondrial envelope membrane	Phatr3_J22873	SLC25A4	Adenine nucleotide translocator, ATP/ADP translocase	4	13.5	32.703	303	36.031	B7G8Y4	2	Mitochondria
	Phatr3_J46448	HSP	Heat shock protein, partial	5	20.3	31.711	281	323.31	B7G195	0	Cytosol?
HSP proteins - stress response	Phatr3_J54019	HSP70A	Heat shock protein HSP70 (Yoneda et al., 2016)	12	23.1	70.961	653	304	B7FQ84	0	Cytosol
	Phatr3_J55230	HSP90	Heat shock protein 90	7	11.8	80.548	709	97.087	B7GES3	0	Cytosol
Mitochondria-targeted chaperonin	Phatr3_J15138	HSP40	Heat shock protein 40/DnaJ heat shock protein (cochaperone of HSP70)	4	8	63.687	590	56.924	B7G7Z2	2	Cytosol
	Phatr3_J24820	CPN60	Chaperonin 60	3	6.6	62.509	594	25.989	B7FQ72	0	Mitochondria
Protein phosphorylation	Phatr3_EG02389	EPK2	EPK 2, cAMP-dependent protein kinase, partial	5	9.4	89.85	819	221.61	B7FUNI	0	Cytosol
	Phatr3_J45679	STK	Serine/threonine-protein kinase	3	6.2	75.453	713	54.773	B7FYI1	1	ER
Ubiquitination	Phatr3_J27118	UBI3	Ubiquitin extension protein 3	3	26.5	17.808	155	24.62	B7FY02	0	Cytosol/nucleus?
	Phatr3_J46098	PUR39	U-box domain-containing protein 39	4	9.4	66.442	618	53.625	B7G022	0	Unknown
Ubiquitin-dependent degradation by the proteasome	Phatr3_J1884	LAP	Leucyl aminopeptidase	5	11.1	66.881	629	48.741	B7FVX9	0	Cytosol

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Functional classification	Protein ID	Gene symbol	Description	Numb. of pept	Seq. cover.	MW (kDa)	Seq. length	Score	Uniprot accession	Numb. of TM	Localization
ER associated protein degradation (ERAD)	Phatr3_J54642	HDCD48	AAA-type ATPase Cdc48	3	5.1	88.486	800	33.986	B5Y3R0	0	Plastid
	Phatr3_EG02643	BIP	ER luminal binding protein	6	10.5	72.265	659	46.858	B7FUB7	0	Endoplasmic reticulum
Cytoskeleton	Phatr3_J51157	ACT1	Actin/actin like protein	4	10.9	41.79	377	104.05	B7G878	0	Cytoskeleton
	Phatr3_J21122	TUBB	Tubulin beta	6	16.6	49.581	447	85.959	B5Y3W7	0	Cytoskeleton
40S small ribosomal subunit	Phatr3_J54534	TUBB	Tubulin beta	4	10.9	49.747	451	47.266	B7G0C3	0	Cytoskeleton
	Phatr3_J6847	RPS9	Ribosomal protein 9	3	18.8	21.272	186	100.7	B7FXJ2	0	Cytosol
	Phatr3_J30486	RPS18	Ribosomal protein 18 40S small ribosomal subunit	5	32.6	16.488	141	155.06	B7GB86	0	Cytosol
	Phatr3_J51066	RPS19	Ribosomal protein 19 40S small ribosomal subunit	3	12.5	17.09	152	22.599	B7G3G6	0	Cytosol
60S large ribosomal subunit	Phatr3_J17545	RPS3a	40S ribosomal protein S3a	5	19.9	28.921	261	44.111	B7FPM3	0	Cytosol
	Phatr3_draft1977	RPL4e	Ribosomal protein 4e 60S large ribosomal subunit	4	14.9	41.571	382	125.56	B7S3I7	0	Cytosol
Eukaryotic translation factor	Phatr3_J30315	RPL18	RPL18, ribosomal protein 18, 60S large ribosomal subunit	3	17.2	21.373	192	26.036	B7GAG0	0	Cytosol
	Phatr3_J30660	p0	60S acidic ribosomal protein p0	4	20.1	29.85	273	45.399	B7GBL1	0	Cytosol
	Phatr3_J28737	EF1A	Elongation factor 1-alpha	4	7.1	48.055	439	76.325	B7G3C4	0	Cytosolic/nuclear
	Phatr3_J35766	EF2	Elongation factor 2	5	6.4	82.337	749	51.095	B7FZ72	0	Cytosolic/nuclear
	Phatr3_J25743	EIF4A	Eukaryotic translation initiation factor 4A	3	8.2	47.206	414	20.355	B5Y531	0	Cytosolic/nuclear
	Phatr3_J54686	Era	GTPase Era	6	5.3	136.53	1226	38.352	B7G2A6	1	Mitochondria
	Phatr3_J34971	H4-1B	Histone H4	5	32	11.383	103	71.208	B7FX68	0	Cytosolic/nuclear
	Phatr3_J21239	H3.3	Histone H3	4	22.8	15.327	136	95.474	B7G218	0	Cytosolic/nuclear
	Phatr3_J54360	H2B-1B	Histone H2B	3	31.9	12.629	116	115.92	B7FWR8	0	Cytosolic/nuclear
	Phatr3_J50872	H3-1C	Histone H3	4	25	15.312	136	13.494	B7FR39	0	Cytosolic/nuclear
PAP fibrillin	Phatr3_J45813	PAPFIB	Plastid lipid-associated protein/fibrillin conserved domain protein	4	15.6	33.606	314	48.681	B7FYR9	0	Plastid
	Phatr3_J49943	PAPFIB	Plastid lipid-associated protein/fibrillin conserved domain protein	7	18.6	47.47	431	101.04	B7GCE0	0	Plastid
Pigments	Phatr3_J50705	LHCF4	Fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein C, chloroplastic	5	31.3	96.452	198	21.328	Q08586	0	Plastid
	Phatr3_J22006	LHCF10	Fucoxanthin chlorophyll a/c protein, chloroplastic	3	11.2	5.8	206	22.154	B7GSB6	0	Plastid
Photosynthesis	Phatr3_J51230	LHCF11	Fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein F, chloroplastic	4	17.8	24.085	197	21.275	Q41094	0	Plastid
	Phatr3_J22395	LHCF8	Fucoxanthin chlorophyll a/c protein	3	13.5	11.644	200	21.651	B7G6Y1	0	Plastid
	Phatr3_J15806	PDS-LIKE3	Phytoene desaturase-like protein	3	5.6	18.915	621	68.012	B7GA36	1	Plastid
	gi 118410963 ref YP_874358.1	psaB	Photosystem I P700 apoprotein A2	7	10.6	79.342	733	81.846	A0T0M7	10	Plastid
	gi 118410982 ref YP_874377.1	psbD	Photosystem II reaction center protein D2	3	9.4	78.031	351	39.077	A0T097	6	Plastid
	gi 19373561.3 ref YP_874376.2	psbC	Photosystem II chlorophyll A core antenna apoprotein CP43	3	8.7	43.852	459	50.141	A0T096	6	Plastid
ATP-synthase	Phatr3_J4937	ATP1	Rubisco expression protein	5	13.1	65.725	594	65.788	B7FR98	0	Plastid
	Phatr3_J42434	ATP1	Rubisco expression protein	4	14	56.116	484	52.383	B7FR99	0	Plastid
	Phatr3_J14618	ATP1	ATP synthase subunit alpha	12	26.1	58.048	544	159.28	B7G531	0	Plastid/ mitochondria?
	Phatr3_J54086	ATPB	ATP synthase subunit beta	5	15	53.618	501	119.04	B7FS46	0	Plastid
	Phatr3_J20657	ATPC	ATP synthase gamma chain	7	26.9	42.297	390	71.62	Q41075	0	Plastid
	Phatr3_J24978	ATPCF1	ATP synthase CF1 alpha subunit	4	11.1	55.922	506	107.56	B7FQ08	0	Plastid
	gi 118411012 ref YP_8744407.1	atpB	ATP synthase CF1 beta chain	4	12	51.62	475	27.984	A0T0D2	0	Plastid
	gi 118411031 ref YP_874426.1	atpA	ATP synthase CF1 alpha chain	5	8.7	54.621	505	6.7554	A0T0F1	0	Plastid

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Functional classification	Protein ID	Gene symbol	Description	Numb. of pept	Seq. cover.	MW (kDa)	Seq. length	Score	Uniprot accession	Numb. of TM	Localization
Predicted protein	Phatr3_J44488		Predicted protein	4	6.4	55.136	530	321.14	B7FUJ4	0	Signal peptide
	Phatr3_J50215		Predicted protein	6	22.6	37.645	350	134.41	B7FXS8	0	Signal peptide
	Phatr3_J49286		Predicted protein	5	19.9	31.929	301	112.6	B7GA37	0	Signal peptide
	Phatr3_EG00979		Predicted protein, partial	3	14.2	30.696	289	26.467		0	?
	Phatr3_J55010		Predicted protein	3	3.1	92.085	843	40.202	B7G9R3	0	Plastid?
	Phatr3_J50214		Predicted protein	5	19	38.707	358	20.143	B7FXS9	0	Signal peptide
	Phatr3_J50236		Predicted protein	4	17	27.078	264	30.499	B7GDE6	0	?
	Phatr3_J13587		Predicted protein, partial	4	7.9	61.195	572	28.494		0	?
	Phatr3_J49287		Predicted protein	4	4.7	127.71	1174	23.128	B7GA38	0	Mitochondria
	Phatr3_EG02301		Predicted protein	6	5.8	131.31	1217	43.511	B7G3N9	3	Signal peptide

specific contaminants, but the detection of the complete flow from protein synthesis to folding and quality control appears as significant.

Eventually, the LD fraction was also enriched in four histone isoforms (H2B-1B, Phatr3_J54360; H3-1C, Phatr3_J50872; H3.3, Phatr3_J21239; H4-1B, Phatr3_J34971), a feature previously described in LDs from *Drosophila* embryos [88]. Histone association to LDs poses the question of a possible role of this organelle in the storage of some specific proteins, mainly histones, in a context where most proteins are degraded.

4. Discussion

4.1. Purity of the *P. tricornutum* LD fraction

A protocol for *P. tricornutum* LD purification has been described previously, by loading broken cells on top of a discontinuous gradient, followed by an ultracentrifugation so as to pellet higher density cell components [49]. We adjusted this first protocol to reduce contamination to a minimum. A possible alternative is to load broken cells at the bottom of the centrifugation tube, under a discontinuous gradient [70,71,89]. We therefore adjusted the broken cell suspension to 1.25 M sucrose and loaded this sample under a 0.7 M-sucrose layer containing Triton X-100. The addition of detergent aimed at washing the low-density LDs from contaminants and large cell debris, while moving to the top of the tube based on their buoyancy. This process might possibly remove weakly bound LD components, which might be lost in our analysis. A 0.25 M-sucrose layer was added at the top for the recovery of LD, without detergent. After 16 h of ultracentrifugation at 68,000 ×g at 4 °C, LDs were clearly separated from cellular debris as assessed by confocal and electron microscopy (Fig. 2). With 99 mol% of TAG and a barely detected amount of MGDG (Fig. 3), the LD fraction presented a high purity. We could also immunodetect the Stramenopile LD protein (StLDP), the only known marker of *P. tricornutum* LD [49,51] in the LD enriched fraction, whereas none of the antibodies raised against other cell compartments could cross-react with LD protein extracts, with the notable exception of an anti-calnexin (αCNX) (Fig. 5). Based on the antibody specificity, a lack of immunodetection might indicate an absence of the antigenic protein or a very low proportion compared to the main pool of this protein in another location of the cell. It is apparently contradictory that the COP1/COPA coatomer subunit could not be immunodetected in the LD fraction, whereas it was detected in the proteomic analysis performed on the same sample. The sensitivity of proteomic approach proved to be higher than the antibody we have developed, and the portion of COP1/COPA associated to LDs is likely much lower than that in other organelles, such as in the set of trafficking vesicles.

We observed a pale yellow color of the purified LD fraction, suggesting the presence of specific pigments. No significant difference was observed for fucoxanthin between total extracts and purified LD fraction (Fig. 4). However, chlorophylls a and c, which are parts of fucoxanthin-chlorophyll protein complexes (FCP) [90,91] were only detected in the total extracts and in very small proportion in the purified fraction. The fucoxanthin molecules we detected therefore belong to a distinct pool. The presence of other low-density lipid bodies from the stroma of the plastid is evidenced, since we detected marker proteins of plastoglobules, i.e. plastid lipid-associated protein (PAP) fibrillins (PAPFIB, Phatr3_J45813 and Phatr3_J49943) (Table 1). Plastoglobules are particular lipid bodies generated in the chloroplast, and could contain carotenoids. Their presence in the LD fraction cannot be avoided by a separation method based on density. They explain why some internal components of the plastid occur in the purified LD fraction, easily identified in the obtained proteome (about 20 proteins, out of 86, see below). The presence of plastoglobules, even in very minor amount, makes it difficult to assess whether the obtained carotenoid profile is strictly associated to the cytosolic LD or to these plastid lipid bodies. The unresolved localization of observed fucoxanthin also

applies to β -carotene, however the presence of this carotenoid in plastoglobules is unlikely and comparison with other eukaryotes supports its presence in cytosolic LDs in *P. tricornutum*.

4.2. A hydrophobic core containing triacylglycerol and devoid of steryl esters

TAG making the bulk of *P. tricornutum* LD are localized in the hydrophobic core of the organelle. The composition of acyl molecular species in TAG did not differ from that in total extracts (Fig. 3) confirming that no undesired hydrolysis had occurred in the course of LD purification. We addressed the presence of other hydrophobic molecules, such as steryl esters, as reported in other eukaryote models [28–30], but we could not detect the presence of any such molecule. As discussed above, the hydrophobic core could also be enriched in fucoxanthin, at the end of synthesis of carotenoids and β -carotene (Fig. 4). The presence of pigments in cytosolic LDs has been described previously in the green alga *Haematococcus pluvialis*. In *H. pluvialis* astaxanthin (a red ketocarotenoid) is synthesized from β -carotene by the action of a β -carotene ketolase, when environmental conditions become unfavorable [92,93]. One model proposes an export of β -carotene from chloroplast to the ER, where it could be converted into astaxanthin, then astaxanthin ester and stored in LD [43,93–95]. In *P. tricornutum* a similar model might be proposed, based on an export of β -carotene from the plastid to the ER or the epiplastid membrane. A gene encoding a putative lycopene cyclase (Phatr3_J8835) can be detected in the genome of *P. tricornutum*. However, the corresponding protein was not detected in the LD proteome, raising questions about its location and function.

4.3. A limiting monolayer containing sulfoquinovosyldiacylglycerol, phosphatidylcholine, brassicasterol and specific molecular species of the betaine lipid

The glycerolipidome of *P. tricornutum* LD contains 0.4 mol% of DGTA, 0.35% of SQDG and 0.15% of PC. Based on the glycerolipid profile of whole cells, dominated by MGDG, the presence of only traces of this galactolipid highlights that detected polar lipids are not contaminants but actual components of the monolayer encapsulating LDs. The presence of SQDG, usually restricted to plastid membranes [5] is therefore remarkable and suggests that the membrane at the origin of the LD in *P. tricornutum* should contain this lipid. By contrast, PC [96] and betaine lipid [97] are usually synthesized in the ER. PC is a glycerophospholipid frequently found in the LD monolayer of several study models, such as mammals [98] or yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* [75,99] and *Pichia pastoris* [100]. PC is known to relocate to the outer leaflet of the outer envelope membrane in primary chloroplasts [101], so it is possible that part of PC lies in the outermost membrane of the plastid in *P. tricornutum*. Eventually, brassicasterol is detected in purified LDs. Sterols are usually restricted to endomembranes and absent from plastids. Nevertheless, they have been detected in the non-photosynthetic secondary plastid in the Apicomplexa *Plasmodium falciparum* [102], and similarly, brassicasterol could also be localized in *Phaeoactylum* plastid membranes.

The precise composition of the four membranes limiting diatom's plastid has not been determined to date [5]. The hybrid presence of a plastid lipid (SQDG) and ER lipids (DGTA, PC, brassicasterol) we report here, supports therefore that the membrane producing LDs is the outermost membrane of the plastid, the epiplastid membrane (EpM). A major question raised by our results is the origin of SQDG in the EpM, either following an export from a site of synthesis within the plastid, or the presence of a synthesis pathway in the EpM.

DGTA is a betaine lipid, a class of glycerolipids, which is not conserved in the evolution of eukaryotes, having two fatty acids esterified in the *sn*-1 and *sn*-2 position and a betaine group connected by an ether bond in the *sn*-3 position (Fig. 3). Three betaines lipid are described in the literature:

1,2-diacylglycerol-3-O-2'-(hydroxymethyl)-(N,N,N-trimethyl)- β -alanine (DGTA), 1,2-diacylglycerol-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine (DGTS) and 1,2-diacylglycerol-3-O-carboxy-(hydroxymethyl)-choline (DGCC). In phosphate deficiency, betaine lipids accumulate in many organisms including diatoms [14,103]. Phosphate starvation leads to a degradation of phospholipids, releasing phosphate for recycling purposes, and current models propose that betaine lipids could compensate the subsequent lack of phospholipids [104]. In systems like diatoms, and based on the present study, betaine lipids could also help in LD biogenesis.

Two molecular species of DGTA are strikingly enriched in *P. tricornutum* LD, with a very simple fatty acyl profile, i.e. containing eicosapentaenoic acid paired with palmitoleic or palmitolenic acids, DGTA 20:5/16:1 and DGTA 20:5/16:2 respectively. The betaine lipid is considered as a platform to synthesize C20:5 very-long chain polyunsaturated fatty acids (VLC-PUFAs), as evidenced by the presence of fatty acid precursors, i.e. C18:1, C18:2, C18:3 and C20:4 in DGTA [24,105–107]. The DGTA molecular species of LDs do not contain these precursors and are therefore sorted downstream C20:5 biosynthesis. Their synthesis should therefore occur in another subcellular location, likely in ER membranes disconnected from the EpM. Furthermore, in the lipidome of *P. tricornutum*, C16:2 is mainly present in MGDG and DGDG and seems absent from ER glycerolipids [14]. The detection of this fatty acid in this pool of DGTA supports an origin from the plastid.

The biosynthetic pathway of betaine lipids was reported only for DGTS in the *Chlamydomonas reinhardtii* and *Nannochloropsis oceanica* models [108,109], and involves a betaine lipid synthase (BTA1). A BTA1 homologue, called BTA1-Like (Phatr3_J42872) has been identified in *P. tricornutum* [20,109]. In two recent transcriptomic studies of *P. tricornutum* exposed to stress leading to TAG accumulation, i.e. following exposure to nitric oxide [20] and to 17 α -ethynylestradiol, a derivative of the natural estrone and estradiol hormones [24], the gene encoding the BTA-like enzyme was upregulated. In the case of 17 α -ethynylestradiol treatment, the overexpression of the betaine lipid synthase coincided with the disruption of the very-long chain polyunsaturated fatty acid synthesis, marked by a decrease of eicosapentaenoic acid (20:5) and an increase in precursor fatty acids (C18:2, C18:3 and C18:4) [24]. We did not find any data regarding the level of expression of BTA1-Like in transcriptome datasets of *P. tricornutum* following nitrogen deficiency [110,111] and the expression of this gene should therefore be investigated in the future to assess whether its expression correlates with LD biogenesis in all known conditions.

Brassicasterol (24-methylcholest-5,22-dien-3 β -ol) is the final product of the sterol biosynthesis pathway in *P. tricornutum* [73]. Sterols and TAG share a common starting point in their biosynthesis, acetyl-CoA, also used for the synthesis of fatty acids in the plastid. Sterols and TAG are therefore in competition with respect to carbon allocation. This was illustrated by either genetic or chemical impairment of sterol synthesis leading to an increase in TAG [24,73]. Based on the polarity of brassicasterol and on its proportion in LD (< 5 mol% brassicasterol, compared to sterol + glycerolipids), we suppose that this free sterol is at the periphery and in the polar lipid monolayer of the LD.

4.4. A proteome indicating a proximity with the endomembrane system

Among the set of 86 proteins (Table 1), we detected six proteins involved in endomembrane trafficking. We first detect two coatomer proteins in the purified lipid LD fraction, COPA (Phatr3_J21929) and COPBETA2 (Phatr3_J27518). These two proteins are part of the COP1 complex. This complex is composed of seven subunits (α , β , β' , γ , ϵ , δ , ζ) and participates in the retrograde transport of vesicles from *trans*-Golgi network to endoplasmic reticulum and in *intra*-Golgi transport [112]. In the unfiltered initial proteome (326 proteins), two other components of the coatomer were present (COPBETA, Phatr3_J54511; and COPGAMMA, Phatr3_J10209) (Supplemental Table S1). Based on the lack of immunodetection of COPA in the LD fraction using an anti-COP1

antibody reacting with proteins from whole cell extracts (Fig. 5), we deduce that only a small fraction of cell COP1 is associated with LD, whereas the rest is likely associated with retrograde vesicles. In *Drosophila*, the COP1 protein complex regulates the composition of perlipines on the surface of the LD and promotes the association of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) on the surface of the LD to initiate lipolysis [113]. Four subunits (α , β , γ_1 and γ_2) of COP1 were also found in the LD proteome of mouse testicular Leydig cells [114]. The complex COP1 is dependent on the presence of ARF1 for its operation [115]. Using an in vitro system, the ARF1/COP1 machinery was shown to allow the synthesis of nano LDs of 60 to 80 nm in mammalian cells, acting therefore in LD homeostasis [116]. In this study, ARF1/COP1 proteins not only localize to LDs to bud nano-LDs, but they are required for targeting specific TAG-synthesis enzymes to LD surfaces. In the unfiltered set of 326 proteins identified in *P. tricornutum* purified LDs, we identified 5 small GTPases (ARF1, Phatr3_J43251; RAB1A, Phatr3_J22713; RABX1, Phatr3_draftJ998; RAN1, Phatr3_J51169 and Phatr3_J36721), including ARF1, suggesting that a similar machinery might operate at the periphery of LDs, possibly controlling the budding of nano-LDs and/or addressing specific enzymes to its surface.

The proteome of *P. tricornutum* LD also highlights two proteins involved in the formation of clathrin, i.e. clathrin heavy chain (CHC, Phatr3_EG01984) and the beta subunit of clathrin adaptor complex AP2 (Phatr3_draftJ1735) (Table 1). The alpha subunit of clathrin adaptor complex AP2 (AP1 alpha, Phatr3_J54442) was detected in the unfiltered proteome (Supplemental Table S1). Clathrins participate in protein transfer outside the *trans* Golgi network [117]. AP1 is involved in autophagosome formation from *trans* Golgi network [118]. The presence of these components further supports a connection with specific cytosolic vesicles. In the unfiltered proteome, we also identified 5 SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) proteins (Supplemental Table S1). SNARE proteins are necessary for fusion of transport vesicles with target membranes [119]. These proteins are notably involved in the COP1 transport as well as in the autophagy mechanism. The SNARE proteins are divided into two categories: R-SNARE (formerly v-SNARE, v for vesicle) and Q-SNARE (formerly t-SNARE, t for target). Fusion between two membranes is favored by the formation of a four-helix bundle composed of one R-SNARE and three Q-SNARE [120]. R corresponds to the addition of an arginine during the fusion whereas Q corresponds to the addition of a glutamine. Of the five SNAREs detected, only one corresponds to a Q-SNARE (Syntaxin-61, Phatr3_EG02404). The other four proteins are R-SNARE (VAMP72, VPS9D1, VPS41 and VPS). VPS proteins are involved in the docking of vesicles to their target membrane [119]. Three other proteins detected in the unfiltered LD proteome are also involved in mechanisms of autophagy and clathrin formation, two annexins (ANX, Phatr3_J44109 and ANXA1, Phatr3_J54190) completing the non-spanin (TM9SF, Phatr3_J13662) detected in the filtered set. A recent study of *P. tricornutum* proteome highlighted an increase in endocytosis and phagosomal activities in nitrogen depleted conditions [121]. The uncharacterized membrane compartment observed by electron microscopy in the vicinity of *P. tricornutum* LDs shows vesicles inside a membrane sack and could possibly correspond to an autophagosome, as observed in other cell types [122,123] (Fig. 1, indicated by a star). The role of these components at the periphery of LDs should therefore be addressed in future works.

We detected a Vacuolar-Type H⁺-ATPase (Phatr3_J51058) in the filtered list and 6 additional V-ATPases in the unfiltered one (Phatr3_J10862, Phatr3_J27923, Phatr3_J29711, Phatr3_J15844, Phatr3_J28794 and Phatr3_J21030). V-ATPases correspond to a family of proton pumps using hydrolysis of ATP to produce a proton gradient in endomembrane vesicles and compartments. This kind of pump is usually found in secretory vesicles as well as in endosomes and lysosomes [124]. A V-ATPase was previously detected in the proteome of the alkenone body (a particular LD storing very long chain ketones) of *Tisochrysis lutea* [125]. Together with components of the endoplasmic-

reticulum-associated protein degradation (ERAD) pathway located in the ER (see below), the proteome of *P. tricornutum* LDs suggests tight connections with different compartments of the endomembrane system (ER, Golgi, Trans-Golgi, trafficking vesicles, clathrin-coated vesicles), consistently with contacts observed by electron microscopy (Fig. 1). The structure and function of these contact sites now need to be structurally and functionally characterized.

4.5. A putative site for mRNA storage and a platform for specific synthesis and folding of proteins, coupled with the ERAD quality control system

The *P. tricornutum* LD proteome contains four proteins involved in post-translational modifications such as ubiquitination (UBI3 - Phatr3_J27118 and PUB39 - Phatr3_J46098) and phosphorylation (STK - Phatr3_J45679 and EPK2 - Phatr3_EG02389). Ubiquitination was previously shown to be a significant post-translational modification controlling lipolysis in plants [126]. Oleosins on the surface of the oleaginous seed LDs are thus ubiquitinated by the attachment of distinct ubiquitin motifs (monoubiquitin Ub, K48-linked diubiquitine K48Ub₂ and K63-linked diubiquitine K63Ub₂) allowing addressing this protein to the 26S proteasome in the cytosol for its degradation [127]. It has been recently shown, by two independent teams, in the pollen tube of *Nicotiana tabacum* and in germinating seedlings of *Arabidopsis thaliana*, that the protein PUX10 (Plant UBX Domain-containing Protein 10), located on the surface of LDs, participated in the recognition of polyubiquitinated K48 motifs with its UBA domain [127,128]. PUX10, via its UBX domain, recruits the AAA-type ATPase Cell Division Cycle 48 protein (CDC48), a protein involved in the ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) pathway. CDC48 is a protein that facilitates the transfer of polyubiquitinated misfolded protein to the 26S proteasome. Interestingly, the CDC48 (Phatr3_J54642) protein is present in *P. tricornutum* LD proteome (Table 1). A second protein involved in the ERAD pathway has also been detected, an ER luminal binding protein (BIP - Phatr3_EG02643), further supporting the association of this system of the LD. BIP participates in the recognition of misfolded proteins, in particular by recognizing hydrophobic regions exposed in an aqueous environment [129,130]. The LD proteome also contains PUB39, belonging to the family of U Box proteins. U box proteins are a family of E3 ubiquitin-protein ligases [131]. E3 ligase participates in the last reaction of the ubiquitination mechanism by recognizing misfolded substrates. Four 26S proteasome proteins (Phatr3_draftJ706, Phatr3_J45122, Phatr3_EG00274, Phatr3_J11735) were also detected in the unfiltered proteome, as well as a protein involved in the recognition of misfolded proteins, a C-type lectin domain family 4 member F (CLEC4F - Phatr3_J50047) (Supplemental Table S1). Altogether, the presence of protein involved in ubiquitination processes and members of the ERAD pathway in the LD proteome suggests that control of the misfolded proteins is achieved at the periphery of this organelle.

Detection of misfolded proteins occurs downstream protein synthesis and folding. Consistently, chaperones, including four heat shock proteins (HSP, Phatr3_J46448; HSP70A, Phatr3_J54019; HSP90, Phatr3_J55230, and HSP40, Phatr3_J15138) were detected (Table 1). The translation of mRNA into proteins at the periphery of LDs is further supported by the presence of 40S and 60S ribosomal subunits and three components of RNA translation machinery, i.e. Elongation factors 1-alpha and 2 (EF1A, Phatr3_J28737; EF2, Phatr3_J35766) and the Eukaryotic translation initiation factor 4A (EIF4A, Phatr3_J25743). Since aminoacids are nitrogen-rich molecules, protein synthesis is not expected in a nitrogen starved context [121,132,133], so the presence of this equipment could find a rational, either for the translation of a specific subset of mRNA, or in preparation of a massive production of proteins when the cells are not stressed any more. In line with this hypothesis, the RAE1 (Ribonucleic Acid Export 1) component of nuclear pore complex, involved in mRNA export [134], was not immunodetected in whole cell extracts after cultivation in the absence of

nitrogen (Fig. 5). We can therefore suppose that the recovery of cells relies on mRNAs stored in the cytosol during starvation. The vicinity of LDs might represent such a site for storing specific pools of mRNA.

4.6. A site for histone protein storage?

Eventually, we detected four histones (H2B-1B, Phatr3_J54360; H3-1C, Phatr3_J50872; H3.3, Phatr3_J21239 and H4-1B, Phatr3_J34971) in the purified fraction of LDs. These histones are components of the octamer forming the nucleosomes. When also considering proteins with < 3 trypsin peptides (240 proteins, Supplemental Table S1), we could also detect other histones of the nucleosome (H2A-3A, Phatr3_J34798; H2A-1, Phatr3_J28445) as well as the H1 linker (H1, Phatr3_J44318). Histones were detected in purified fractions of LDs from other organisms: *Drosophila melanogaster* young whole embryos [135], the tobacco sphinx *Manduca sexta* [136], the filamentous fungi *Mortierella alpina* [137], Mammalian cells like adipocyte [138], macrophages [139], β -pancreatic cells [140] and in adipose tissue [141].

In the case of *Drosophila melanogaster*, whereas present in embryo, these histones were not detected in the abdominal fatbody proteome [142]. The specific association of histones to embryo-LDs is ensured by the Jabba protein [88]. We did not identify any Jabba homologue in the genome of *P. tricornutum*, suggesting that another protein might recruit histones to the surface of LDs. The storage of these nucleosome components may prepare cell division and chromatin packaging, when cells are not stressed anymore.

4.7. Can we learn from a proteome obtained with a lower stringency?

Proteomic analyses of the LD allowed the detection of 326 proteins in the purified fraction. We applied two filters to limit the detection of unspecific contaminants, one based on peptide stringency and one based on a decrease at whole cell level following nitrogen starvation. These filters have reduced the number of proteins to 86. Although it helped remove unspecific contaminants, as stated above, this procedure may also lead to a loss of information on the protein composition of LDs. We sought whether components commonly encountered in LD proteomes, had been identified in this initial list. Concerning LD biogenesis, Seipin is an ER protein having two transmembrane domains and a luminal loop, involved in LD early development [143]. A functional study of *P. tricornutum* Seipin (Phatr3_J47296) suggests a similar role [78]. This protein is generally not detected in LD proteomes and we did not detect this sequence in the initial list, consistently with Western blot analyses (Fig. 5). Concerning TAG biosynthesis, we did not detect any enzymes responsible for the last step of synthesis, such as DGAT or PDAT, often detected in LDs. In the set of 86 proteins, three proteins were detected as participating in lipid metabolism: a fatty acid synthesis enzyme, Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1, Phatr3_EG01955) and two proteins involved in acyl-CoA homeostasis, a long chain acyl-CoA synthetase 4 (ACS4, Phatr3_J45510), a class II protein, and a LD acyl-CoA binding protein (LD-ACBD, Phatr3_J48778) previously described [49]. In the unfiltered set, we could detect 11 proteins involved in lipid metabolism, including fatty acid synthesis (triose phosphate/phosphate translocator, TPT1, Phatr3_J24610; 3R-hydroxyacyl-ACP dehydrase, FABZ_1, Phatr3_J1143), acyl-CoA biosynthesis (long chain acyl-CoA synthetase, ACS1, Phatr3_J20143) and β -oxidation in the mitochondrion (acyl-CoA deshydrogenase-like protein, ACAD, Phatr3_J11014) (Supplemental Table S1). CGI-58 is one of the proteins frequently associated with LDs [79–81] (Phatr3_J54974) and past studies in the diatom *Thalassiosira pseudonana* indicated a role of CGI-58 in LD hydrolysis [144]. CGI-58 was neither detected in the unfiltered LD proteome, nor by LD immunostaining with an anti-CGI-58 antibody (Fig. 5) Either CGI-58 is localized at the peroxisome level as in higher plants [145], or it might associate to LDs in conditions where TAGs need to be hydrolyzed. Eventually, the detection of TPT1 (Phatr3_J24610) in the unfiltered proteome of *P. tricornutum* LD supports a tight association

with the surface of the outermost membrane of the plastid. We have developed an antibody against TPT1, with a moderate reactivity at the whole cell level (Fig. 5).

5. Conclusion

This work allowed the most refined characterization of the architecture of the LD in a diatom, upon nitrogen starvation. The LD of *P. tricornutum* has a hydrophobic core mainly composed of TAG. We also detected brassicasterol and β -carotene. The hydrophobic core is surrounded by a monolayer of polar lipids composed of DGTA (DGTA 20:5-16:1 and DGTA 20:5-16:2) and PC, possibly from the ER, and SQDG from the plastid. The extremely low content in MGDG does not support a biogenesis from the innermost two membranes (the IEM and OEM) of the plastid. Together with electron microscopy observation and the detection of TPT1 in the LD proteome, these results support a biogenesis of LDs from the outermost membrane of the plastid, the EpM. The origin of SQDG in the EpM, either by a transfer from more internal membranes or by in situ synthesis needs to be determined. Likewise, the export of a specific DGTA molecular species from other endomembranes to the EpM had never been shown or hypothesized prior to this work. This localization is consistent with the recent discovery of a TAG lipase associated to the chloroplast limiting membranes in *P. tricornutum* [146]. The LD proteome obtained in three independent biological replicates, based on detection of at least three trypsin peptides, and following subtraction of proteins downregulated by nitrogen starvation, highlights 86 proteins, including the only protein marker known for *P. tricornutum* LD (StLDP). Based on this most 'stringent' list, free of contaminants, we could identify connections with specific compartments and families of proteins, confirmed by the identification of additional components in the unfiltered complete LD proteome. LD-associated proteins suggest connections with vesicular trafficking (coatamer, clathrin), cytoskeleton, plastid and mitochondria. Unsuspected LD-associated functions include protein synthesis (ribosomes), folding (chaperones), posttranslational modifications and quality control (ubiquitination and ERAD pathway), possibly preparing translation of specific mRNAs. The detection of all histone proteins, as previously demonstrated in LDs from drosophila embryos, also suggests the storage of these nucleosome components, preparing cell division and chromatin packaging, when cells are not stressed anymore. Functional characterization and cellular localization studies should be conducted in the future to better understand the role of these proteins in *P. tricornutum*, in the course of LD formation and degradation, and in the context of nitrogen availability and other environmental stresses.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101415>.

Acknowledgements

This work was supported by a Flagship program from the CEA High Commissioner and the French National Research Agency (Oceanomics Project No. ANR-11-BTBR-0008, GlycoAlps Project No. ANR-15-IDEX-02 and ANR-10-INBS-08 ProFI).

List of author contributions

J.L. performed most of the experiments. C.M. provided support for lipid droplet purification. A.J. provided support for confocal imaging. S.B., K.S., M.T. and Y.C realized the proteomic analyses. H.S. performed sterol analyses. M.K. performed pigments analyses. J.S. designed the antibodies for Western blotting analyses. D.F., P.H.J. and J.L.P. performed electron microscopy analyses. J.J. and F.R. provided specific expertise in glycerolipid analyses. E.M. conceived the project. All the authors contributed to the writing of the article.

Conflict of interests

Authors declare that there is no financial or other interests that could be perceived to influence the outcomes of the research.

Statement of informed consent, human/animal rights

No conflicts, informed consent, human or animal rights applicable.

Author's agreement to authorship

All authors have seen, approved and are fully conversant with the contents of the manuscript, and agree to authorship and submission of the manuscript for peer review.

References

- [1] D.A. Caron, P.D. Countway, A.C. Jones, D.Y. Kim, A. Schnetzer, Marine protistan diversity, *Annu. Rev. Mar. Sci.* 4 (2012) 467–493.
- [2] E. Marechal, Primary endosymbiosis: emergence of the primary chloroplast and the chromatophore, two independent events, *Methods Mol. Biol.* 1829 (2018) 3–16.
- [3] G.I. McFadden, Chloroplast origin and integration, *Plant Physiol.* 125 (2001) 50–53.
- [4] F.A. Wollman, An antimicrobial origin of transit peptides accounts for early endosymbiotic events, *Traffic* 17 (2016) 1322–1328.
- [5] D. Petroustos, S. Amiar, H. Abida, L.-J. Dolch, O. Bastien, F. Rébeillé, J. Jouhet, D. Falconet, M.A. Block, G.I. McFadden, C. Bowler, C. Botté, E. Maréchal, Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways – from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids, *Prog. Lipid Res.* 54 (2014) 68–85.
- [6] Z. Fussy, M. Obornik, Complex endosymbioses I: from primary to complex plastids, multiple independent events, *Methods Mol. Biol.* 1829 (2018) 17–35.
- [7] T. Cavalier-Smith, Kingdom chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences, *Protoplasma* 255 (2018) 297–357.
- [8] A.S. Benoiton, F.M. Ibarbalz, L. Bittner, L. Guidi, O. Jahn, S. Dutkiewicz, C. Bowler, The evolution of diatoms and their biogeochemical functions, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 372 (2017).
- [9] O. Levitan, J. Dinamarca, G. Hochman, P.G. Falkowski, Diatoms: a fossil fuel of the future, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 117–124.
- [10] J. Lupette, Eric Maréchal, Phytoplankton Glycerolipids, Challenging but Promising Prospects from Biomedicine to Green Chemistry and Biofuels, Wiley VCH, Weinheim, Germany, 2018.
- [11] M.A. Scaife, A.G. Smith, Towards developing algal synthetic biology, *Biochem. Soc. Trans.* 44 (2016) 716–722.
- [12] J.K. Wang, M. Seibert, Prospects for commercial production of diatoms, *Biotechnol. Biofuels* 10 (2017) 16.
- [13] C. Bowler, A.E. Allen, J.H. Badger, J. Grimwood, K. Jabbari, A. Kuo, U. Maheswari, C. Martens, F. Maumus, R.P. Otilar, E. Rayko, A. Salamov, K. Vandepoel, B. Beszteri, A. Gruber, M. Hejide, M. Katinka, T. Mock, K. Valentin, F. Verret, J.A. Berges, C. Brownlee, J.P. Cadoret, A. Chiovitti, C.J. Choi, S. Coesel, A. De Martino, J.C. Detter, C. Durkin, A. Falciatore, J. Fournet, M. Haruta, M.J. Huysman, B.D. Jenkins, K. Jiroutova, R.E. Jorgensen, Y. Joubert, A. Kaplan, N. Kroger, P.G. Kroth, J. La Roche, E. Lindquist, M. Lommer, V. Martin-Jezequel, P.J. Lopez, S. Lucas, M. Mangogna, K. McGinnis, L.K. Medlin, A. Montsant, M.P. Oudot-Le Secq, C. Napoli, M. Obornik, M.S. Parker, J.L. Petit, B.M. Porcel, N. Poulsen, M. Robison, L. Rychlewski, T.A. Rynearson, J. Schmutz, H. Shapiro, M. Siant, M. Stanley, M.R. Sussman, A.R. Taylor, A. Vardi, P. von Dassow, W. Vyverman, A. Willis, L.S. Wyrwicz, D.S. Rokhsar, J. Weissenbach, E.V. Armbrust, B.R. Green, Y. Van de Peer, I.V. Grigoriev, The phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes, *Nature* 456 (2008) 239–244.
- [14] H. Abida, L.J. Dolch, C. Mei, V. Villanova, M. Conte, M.A. Block, G. Finazzi, O. Bastien, L. Tirichine, C. Bowler, F. Rebeille, D. Petroustos, J. Jouhet, E. Marechal, Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*, *Plant Physiol.* 167 (2015) 118–136.
- [15] P.G. Kroth, A.M. Bones, F. Daboussi, M.I. Ferrante, M. Jaubert, M. Kolot, M. Nymark, C. Rio Bartulos, A. Ritter, M.T. Russo, M. Serif, P. Winge, A. Falciatore, Genome editing in diatoms: achievements and goals, *Plant Cell Rep.* 37 (2018) 1401–1408.
- [16] H.M. Nguyen, M. Baudet, S. Cuiñé, J.-M. Adriano, D. Barthe, E. Billon, C. Bruley, F. Beisson, G. Peltier, M. Ferro, Y. Li-Beisson, Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism, *Proteomics* 11 (2011) 4266–4273.
- [17] J. Popko, C. Herrfurth, K. Feussner, T. Ischebeck, T. Iven, R. Haslam, M. Hamilton, O. Sayanova, J. Napier, I. Khozin-Goldberg, I. Feussner, Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*, *PLoS One* 11 (2016) e0164673.
- [18] S. Yao, A. Brandt, H. Egsgaard, C. Gjermansen, Neutral lipid accumulation at elevated temperature in conditional mutants of two microalgae species, *Plant Physiol. Biochem.* 61 (2012) 71–79.
- [19] A. Alboresi, G. Perin, N. Vitulo, G. Diretto, M. Block, J. Jouhet, A. Meneghesso, G. Valle, G. Giuliano, E. Marechal, T. Morosinotto, Light remodels lipid biosynthesis in *Nannochloropsis gaditana* by modulating carbon partitioning between organelles, *Plant Physiol.* 171 (2016) 2468–2482.
- [20] L.-J. Dolch, J. Lupette, G. Tourcier, M. Bedhomme, S. Collin, L. Magneschi, M. Conte, K. Seddiki, C. Richard, E. Corre, L. Fourage, F. Laeuffer, R. Richards, M. Reith, F. Rébeillé, J. Jouhet, P. McGinn, E. Maréchal, Nitric oxide mediates nitrite-sensing and acclimation and triggers a remodeling of lipids, *Plant Physiol.* 175 (2017) 1407.
- [21] A.R. Burch, A.K. Franz, Combined nitrogen limitation and hydrogen peroxide treatment enhances neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Bioresour. Technol.* 219 (2016) 559–565.
- [22] J.R. Collins, B.R. Edwards, H.F. Fredricks, B.A.S. Van Mooy, LOBSTAHS: an adduct-based lipidomics strategy for discovery and identification of oxidative stress biomarkers, *Anal. Chem.* 88 (2016) 7154–7162.
- [23] J. Lupette, Antoine Jaussaud, Claire Vigor, Camille Oger, Jean-Marie Galano, Guillaume Réversat, Joseph Vercauteren, Juliette Jouhet, Thierry Durand, Eric Maréchal, Non-enzymatic synthesis of bioactive isoprostanoids in phaeodactylum following oxidative stress, *Plant Physiol.* 178 (2018) 1344–1357.
- [24] M. Conte, J. Lupette, K. Seddiki, C. Mei, L.-J. Dolch, V. Gros, C. Barette, F. Rébeillé, J. Jouhet, E. Maréchal, Screening for biologically annotated drugs that trigger triacylglycerol accumulation in the diatom phaeodactylum, *Plant Physiol.* 177 (2018) 532.
- [25] N. Wase, P. Black, C. DiRusso, Innovations in improving lipid production: algal chemical genetics, *Prog. Lipid Res.* 71 (2018) 101–123.
- [26] N. Wase, B. Tu, J.W. Allen, P.N. Black, C.C. DiRusso, Identification and metabolite profiling of chemical activators of lipid accumulation in green algae, *Plant Physiol.* 174 (2017) 2146–2165.
- [27] H. Kim, S. Jang, S. Kim, Y. Yamaoka, D. Hong, W.Y. Song, I. Nishida, Y. Li-Beisson, Y. Lee, The small molecule fenpropimorph rapidly converts chloroplast membrane lipids to triacylglycerols in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 54.
- [28] T.C. Walther, J. Chung, R.V. Farese Jr., Lipid droplet biogenesis, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33 (2017) 491–510.
- [29] C. Zhang, P. Liu, The lipid droplet: a conserved cellular organelle, *Protein Cell* 8 (2017) 796–800.
- [30] D.J. Murphy, The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaemia to mammals, *Protoplasma* 249 (2012) 541–585.
- [31] D.J. Murphy, The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms, *Prog. Lipid Res.* 40 (2001) 325–438.
- [32] A. Pol, S.P. Gross, R.G. Parton, Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites, *J. Cell Biol.* 204 (2014) 635–646.
- [33] F. Wilfling, J.T. Haas, T.C. Walther, R.V.F. Jr, Lipid droplet biogenesis, *Curr. Opin. Cell Biol.* 29 (2014) 39–45.
- [34] W.M. Henne, M.L. Reese, J.M. Goodman, The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells, *EMBO J.* 37 (2018).
- [35] M.H. den Brok, T.K. Raaijmakers, E. Collado-Camps, G.J. Adema, Lipid droplets as immune modulators in myeloid cells, *Trends Immunol.* 39 (2018) 380–392.
- [36] N. Kory, R.V. Farese Jr., T.C. Walther, Targeting fat: mechanisms of protein localization to lipid droplets, *Trends Cell Biol.* 26 (2016) 535–546.
- [37] K.D. Chapman, J.M. Dyer, R.T. Mullen, Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 215–226.
- [38] A.H.C. Huang, Plant lipid droplets and their associated proteins: potential for rapid advances, *Plant Physiol.* 176 (2018) 1894–1918.
- [39] H. Itabe, T. Yamaguchi, S. Nimura, N. Sasabe, Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins, *Lipids Health Dis.* 16 (2017) 83.
- [40] E.R. Moellering, C. Benning, RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot. Cell* 9 (2010) 97–106.
- [41] G.O. James, C.H. Hocart, W. Hillier, H. Chen, F. Kordbacheh, G.D. Price, M.A. Djordjevic, Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 3343–3351.
- [42] I.P. Lin, P.L. Jiang, C.S. Chen, J.T. Tzen, A unique caleosin serving as the major integral protein in oil bodies isolated from *Chlorella* sp. cells cultured with limited nitrogen, *Plant Physiol. Biochem.* 61 (2012) 80–87.
- [43] E. Peled, S. Leu, A. Zarka, M. Weiss, U. Pick, I. Khozin-Goldberg, S. Boussiba, Isolation of a novel oil globule protein from the green alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*), *Lipids* 46 (2011) 851–861.
- [44] L. Davidi, A. Katz, U. Pick, Characterization of major lipid droplet proteins from *Dunaliella*, *Planta* 236 (2012) 19–33.
- [45] A. Javee, S.B. Sulochana, S.J. Pallissery, M. Arumugam, Major lipid body protein: a conserved structural component of lipid body accumulated during abiotic stress in *S. quadricauda* CASA-CC202, *Front. Energy Res.* 4 (2016).
- [46] H. Sieglér, O. Valerius, T. Ischebeck, J. Popko, N.J. Tourasse, O. Vallon, I. Khozin-Goldberg, G.H. Braus, I. Feussner, Analysis of the lipid body proteome of the oleaginous alga *Lobosphaera incisa*, *BMC Plant Biol.* 17 (2017) 98.
- [47] S. Flori, P.-H. Jouneau, G. Finazzi, E. Maréchal, D. Falconet, Ultrastructure of the periplastidial compartment of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Protist* 167 (2016) 254–267.
- [48] D. Nojima, T. Yoshino, Y. Maeda, M. Tanaka, M. Nemoto, T. Tanaka, Proteomics analysis of oil body-associated proteins in the oleaginous diatom, *J. Proteome Res.*

- 12 (2013) 5293–5301.
- [49] K. Yoneda, M. Yoshida, I. Suzuki, M.M. Watanabe, Identification of a major lipid droplet protein in a marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*, *Plant Cell Physiol.* 57 (2016) 397–406.
- [50] A. Vieler, S.B. Brubaker, B. Vick, C. Benning, A lipid droplet protein of *Nannochloropsis* with functions partially analogous to plant oleosins, *Plant Physiol.* 158 (2012) 1562.
- [51] K. Yoneda, M. Yoshida, I. Suzuki, M.M. Watanabe, Homologous expression of lipid droplet protein-enhanced neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*, *J. Appl. Phycol.* 30 (2018) 2793–2802.
- [52] A. Falciatore, M.R. d'Alcalá, P. Croot, C. Bowler, Perception of environmental signals by a marine diatom, *Science* 288 (2000) 2363–2366.
- [53] K.E. Cooksey, J.B. Guckert, S.A. Williams, P.R. Callis, Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red, *J. Microbiol. Methods* 6 (1987) 333–345.
- [54] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [55] D. Simionato, M.A. Block, N. La Rocca, J. Jouhet, E. Marechal, G. Finazzi, T. Morosinotto, The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus, *Eukaryot. Cell* 12 (2013) 665–676.
- [56] G.E. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.
- [57] J. Jouhet, E. Marechal, R. Bligny, J. Joyard, M.A. Block, Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation, *FEBS Lett.* 544 (2003) 63–68.
- [58] J. Jouhet, J. Lupette, O. Clerc, L. Magneschi, M. Bedhomme, S. Collin, S. Roy, E. Maréchal, F. Rébeillé, LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation, *PLoS One* 12 (2017) e0182423.
- [59] B. Deme, C. Cataye, M.A. Block, E. Marechal, J. Jouhet, Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids, *FASEB J.* 28 (2014) 3373–3383.
- [60] C.M. Buseman, P. Tamura, A.A. Sparks, E.J. Baughman, S. Maatta, J. Zhao, M.R. Roth, S.W. Esch, J. Shah, T.D. Williams, R. Welti, Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves, *Plant Physiol.* 142 (2006) 28.
- [61] J. Cox, M. Mann, MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 1367.
- [62] B. Schwannhäusser, D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, M. Selbach, Global quantification of mammalian gene expression control, *Nature* 473 (2011) 337.
- [63] T.N. Petersen, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nat. Methods* 8 (2011) 785–786.
- [64] O. Emanuelsson, H. Nielsen, G. von Heijne, ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites, *Protein Sci.* 8 (1999) 978–984.
- [65] A. Gruber, G. Roca, P.G. Kroth, E.V. Armbrust, T. Mock, Plastid proteome prediction for diatoms and other algae with secondary plastids of the red lineage, *Plant J.* 81 (2015) 519–528.
- [66] E.L.L. Sonnhammer, G.V. Heijne, A. Krogh, A hidden markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences, *Proceedings of the 6th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, AAAI Press, 1998, pp. 175–182.
- [67] L.P. Kozlowski, IPC – isoelectric point calculator, *Biol. Direct* 11 (2016) 55.
- [68] W.J. Hurkman, C.K. Tanaka, Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis, *Plant Physiol.* 81 (1986) 802.
- [69] S. Flori, P.H. Jouneau, B. Gallet, L.F. Estrozi, C. Morisot, G. Schoehn, G. Finazzi, D. Falconet, Imaging plastids in 2D and 3D: confocal and electron microscopy, *Methods Mol. Biol.* 1829 (2018) 113–122.
- [70] D.L. Brasaemle, T. Barber, N.E. Wolins, G. Serrero, E.J. Blanchette-Mackie, C. Londos, Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein, *J. Lipid Res.* 38 (1997) 2249–2263.
- [71] D.L. Brasaemle, N.E. Wolins, Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation, *Curr. Protoc. Cell Biol.* 72 (2016) 3 15 11–13 15 13.
- [72] S.W. Rampen, B.A. Abbas, S. Schouten, J.S.S. Damste, A comprehensive study of sterols in marine diatoms (Bacillariophyta): implications for their use as tracers for diatom productivity, *Limnol. Oceanogr.* 55 (2010) 91–105.
- [73] M. Fabris, M. Matthijs, S. Carbonelle, T. Moses, J. Pollier, R. Dasseville, G.J. Baart, W. Vyverman, A. Goossens, Tracking the sterol biosynthesis pathway of the diatom *Phaeodactylum tricoratum*, *New Phytol.* 204 (2014) 521–535.
- [74] S. Lopez, B. Bermudez, S. Montserrat-de la Paz, S. Jaramillo, L.M. Varela, A. Ortega-Gomez, R. Abia, F.J. Muriana, Membrane composition and dynamics: a target of bioactive virgin olive oil constituents, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 1638–1656.
- [75] K. Tauchi-Sato, S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, T. Fujimoto, The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 44507–44512.
- [76] G. Onal, O. Kutlu, D. Gozuacik, S. Dokmeci Emre, Lipid droplets in health and disease, *Lipids Health Dis.* 16 (2017) 128.
- [77] Z. Yi, M. Xu, M. Magnusdotir, Y. Zhang, S. Brynjolfsson, W. Fu, Photo-oxidative stress-driven mutagenesis and adaptive evolution on the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* for enhanced carotenoid accumulation, *Mar. Drugs* 13 (2015) 6138–6151.
- [78] Y. Lu, X. Wang, S. Balamurugan, W.D. Yang, J.S. Liu, H.P. Dong, H.Y. Li, Identification of a putative seipin ortholog involved in lipid accumulation in marine microalga *Phaeodactylum tricoratum*, *J. Appl. Phycol.* 29 (2017) 2821–2829.
- [79] K.L. Farquharson, Deciphering the role of CGI-58 in lipid metabolism in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 25 (2013) 1485.
- [80] S. Park, S.K. Gidda, C.N. James, P.J. Horn, N. Khuu, D.C. Seay, J. Keereetawee, K.D. Chapman, R.T. Mullen, J.M. Dyer, The alpha/beta hydrolase CGI-58 and peroxisomal transport protein PXA1 coregulate lipid homeostasis and signaling in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 25 (2013) 1726–1739.
- [81] A. Khatib, Y. Arhab, A. Bentebibel, A. Abousalham, A. Noiri, Reassessing the potential activities of plant CGI-58 protein, *PLoS One* 11 (2016) e0145806.
- [82] D. Moog, S.A. Rensing, J.M. Archibald, U.G. Maier, K.K. Ullrich, Localization and evolution of putative triose phosphate translocators in the diatom *Phaeodactylum tricoratum*, *Genome Biol. Evol.* 7 (2015) 2955–2969.
- [83] Y. Laizet, D. Pontier, R. Mache, M. Kuntz, Subfamily organization and phylogenetic origin of genes encoding plastid lipid-associated proteins of the fibrillin type, *J. Genome Sci. Technol.* 3 (2004) 19–28.
- [84] A. Yousef, Y.H. Laizet, M.A. Block, E. Maréchal, J.-P. Alcaraz, T.R. Larson, D. Pontier, J. Gaffé, M. Kuntz, Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress, *Plant J.* 61 (2010) 436–445.
- [85] C. Bréhélin, F. Kessler, K.J. van Wijk, Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids, *Trends Plant Sci.* 12 (2007) 260–266.
- [86] H.D. Gould, S. Cuine, B. Legeret, Y. Liang, S. Brugiere, P. Auroy, H. Javot, M. Tardif, B. Jones, F. Beisson, G. Peltier, Y. Li-Beisson, Saturating light induces sustained accumulation of oil in plastidial lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 171 (2016) 2406–2417.
- [87] T. Moriyama, M. Toyoshima, M. Saito, H. Wada, N. Sato, Revisiting the algal “chloroplast lipid droplet”: the absence of an entity that is unlikely to exist, *Plant Physiol.* 176 (2018) 1519–1530.
- [88] Z. Li, K. Thiel, Peter J. Thul, M. Beller, Ronald P. Kühnlein, Michael A. Welte, Lipid droplets control the maternal histone supply of *Drosophila* embryos, *Curr. Biol.* 22 (2012) 2104–2113.
- [89] D.L. Brasaemle, G. Dolios, L. Shapiro, R. Wang, Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 46835–46842.
- [90] A. Gelzinis, V. Butkus, E. Songaila, R. Augulis, A. Gall, C. Buchel, B. Robert, D. Abramavicius, D. Zigmantas, L. Valkunas, Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll protein complex, *Biochim. Biophys. Acta* 1847 (2015) 241–247.
- [91] P. Kuczynska, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka, Photosynthetic pigments in diatoms, *Mar. Drugs* 13 (2015) 5847–5881.
- [92] J.-C. Huang, F. Chen, G. Sandmann, Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*, *J. Biotechnol.* 122 (2006) 176–185.
- [93] G. Chen, B. Wang, D. Han, M. Sommerfeld, Y. Lu, F. Chen, Q. Hu, Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae), *Plant J.* 81 (2015) 95–107.
- [94] K. Grünewald, J. Hirschberg, C. Hagen, Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6023–6029.
- [95] S. Ota, A. Morita, S. Ohnuki, A. Hirata, S. Sekida, K. Okuda, Y. Ohya, S. Kawano, Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*, *Sci. Rep.* 8 (2018) 5617.
- [96] T.S. Moore, Phosphatidylcholine synthesis in castor bean endosperm, *Plant Physiol.* 57 (1976) 382–386.
- [97] T.S. Moore, Z. Du, Z. Chen, Membrane lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. In vitro biosynthesis of diacylglyceryltrimethylhomoserine, *Plant Physiol.* 125 (2001) 423–429.
- [98] R. Bartz, W.H. Li, B. Venables, J.K. Zehmer, M.R. Roth, R. Welti, R.G. Anderson, P. Liu, K.D. Chapman, Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 837–847.
- [99] K. Grillitsch, M. Connerth, H. Kofeler, T.N. Arrey, B. Rietschel, B. Wagner, M. Karas, G. Daum, Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: lipidome meets proteome, *Biochim. Biophys. Acta* 1811 (2011) 1165–1176.
- [100] V.A. Ivashov, K. Grillitsch, H. Kofeler, E. Leitner, D. Baeumlisberger, M. Karas, G. Daum, Lipidome and proteome of lipid droplets from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (2013) 282–290.
- [101] C. Botella, E. Sautron, L. Boudiere, M. Michaud, E. Dubots, Y. Yamaryo-Botte, C. Albrieux, E. Marechal, M.A. Block, J. Jouhet, ALA10, a phospholipid flippase, controls FAD2/FAD3 desaturation of phosphatidylcholine in the ER and affects chloroplast lipid composition in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* 170 (2016) 1300–1314.
- [102] C.Y. Botte, Y. Yamaryo-Botte, T.W. Rupasinghe, K.A. Mullin, J.I. MacRae, T.P. Spurck, M. Kalanon, M.J. Shears, R.L. Coppel, P.K. Crellin, E. Marechal, M.J. McConville, G.I. McFadden, Atypical lipid composition in the purified relict plastid (apicoplast) of malaria parasites, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 7506–7511.
- [103] B.A. Van Mooy, H.F. Fredricks, B.E. Pedler, S.T. Dyhrman, D.M. Karl, M. Koblizek, M.W. Lomas, T.J. Mincer, L.R. Moore, T. Moutin, M.S. Rappe, E.A. Webb, Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity, *Nature* 458 (2009) 69–72.
- [104] C. Benning, Z.H. Huang, D.A. Gage, Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation,

- Arch. Biochem. Biophys. 317 (1995) 103–111.
- [105] L.J. Dolch, E. Marechal, Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum*, Mar. Drugs 13 (2015) 1317–1339.
- [106] O. Sayanova, J.A. Napier, Transgenic oilseed crops as an alternative to fish oils, Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids 85 (2011) 253–260.
- [107] O. Sayanova, V. Mimouni, L. Ulmann, A. Morant-Manceau, V. Pasquet, B. Schoefs, J.A. Napier, Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms, Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 372 (2017).
- [108] W.R. Riekhof, B.B. Sears, C. Benning, Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr, Eukaryot. Cell 4 (2005) 242–252.
- [109] H. Murakami, T. Nobusawa, K. Hori, M. Shimojima, H. Ohta, Betaine lipid is crucial for adapting to low temperature and phosphate deficiency in *Nannochloropsis*, Plant Physiol. 177 (2018) 181–193.
- [110] L. Alipanah, J. Rohloff, P. Winge, A.M. Bones, T. Brembu, Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*, J. Exp. Bot. 66 (2015) 6281–6296.
- [111] O. Levitan, J. Dinamarca, E. Zelzion, D.S. Lun, L.T. Guerra, M.K. Kim, J. Kim, B.A. Van Mooy, D. Bhattacharya, P.G. Falkowski, Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen stress, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112 (2015) 412–417.
- [112] R. Beck, M. Rawet, F.T. Wieland, D. Cassel, The COPI system: molecular mechanisms and function, FEBS Lett. 583 (2009) 2701–2709.
- [113] M. Beller, C. Sztalryd, N. Southall, M. Bell, H. Jackle, D.S. Auld, B. Oliver, COPI complex is a regulator of lipid homeostasis, PLoS Biol. 6 (2008) e292.
- [114] W. Wang, S. Wei, L. Li, X. Su, C. Du, F. Li, B. Geng, P. Liu, G. Xu, Proteomic analysis of murine testes lipid droplets, Sci. Rep. 5 (2015) 12070.
- [115] T. Serafini, L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R.A. Kahn, J.E. Rothman, ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein, Cell 67 (1991) 239–253.
- [116] F. Wilfling, A.R. Thiam, M.J. Olarte, J. Wang, R. Beck, T.J. Gould, E.S. Allgeyer, F. Pincet, J. Bewersdorf, R.V. Farese Jr., T.C. Walther, Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting, eLife 3 (2014) e01607.
- [117] G. Jurgens, Membrane trafficking in plants, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20 (2004) 481–504.
- [118] Y. Guo, C. Chang, R. Huang, B. Liu, L. Bao, W. Liu, AP1 is essential for generation of autophagosomes from the trans-Golgi network, J. Cell Sci. 125 (2012) 1706–1715.
- [119] K. Soreng, T.P. Neufeld, A. Simonsen, Membrane trafficking in autophagy, Int. Rev. Cell Mol. Biol. 336 (2018) 1–92.
- [120] S. Martens, H.T. McMahon, Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 543–556.
- [121] J. Longworth, D. Wu, M. Huete-Ortega, P.C. Wright, S. Vaidyanathan, Proteome response of *Phaeodactylum tricorutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion, Algal Res. 18 (2016) 213–224.
- [122] T. Ma, Y.Y. Li, J. Zhu, L.L. Fan, W.D. Du, C.H. Wu, G.P. Sun, J.B. Li, Enhanced autophagic flux by endoplasmic reticulum stress in human hepatocellular carcinoma cells contributes to the maintenance of cell viability, Oncol. Rep. 30 (2013) 433–440.
- [123] B. Pajak, M. Songin, J.B. Strosznajder, A. Orzechowski, B. Gajkowska, Ultrastructural evidence of amyloid beta-induced autophagy in PC12 cells, Folia Neuropathol. 47 (2009) 252–258.
- [124] N. Nelson, N. Perzov, A. Cohen, K. Hagai, V. Padler, H. Nelson, The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases, J. Exp. Biol. 203 (2000) 89–95.
- [125] Q. Shi, H. Araie, R.K. Bakku, Y. Fukao, R. Rakwal, I. Suzuki, Y. Shiraiwa, Proteomic analysis of lipid body from the alkenone-producing marine haptophyte alga *Tisochrysis lutea*, Proteomics 15 (2015) 4145–4158.
- [126] S. D'Andrea, Lipid droplet mobilization: the different ways to loosen the purse strings, Biochimie 120 (2016) 17–27.
- [127] C. Deruyffelaere, Z. Purkrtova, I. Bouchez, B. Collet, J.L. Cacas, T. Chardot, J.L. Gallois, S. D'Andrea, PUX10 associates with CDC48A and regulates the dislocation of ubiquitinated oleosins from seed lipid droplets, Plant Cell 30 (2018) 2116–2136.
- [128] F.K. Kretzschmar, L.F. Mengel, A. Muller, K. Schmitt, K.F. Biersch, O. Valerius, G. Braus, T. Ischebeck, PUX10 is a lipid droplet-localized scaffold protein that interacts with CDC48 and is involved in the degradation of lipid droplet proteins, Plant Cell 30 (2018) 2137–2160.
- [129] Y. Okuda-Shimizu, L.M. Hendershot, Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp, Mol. Cell 28 (2007) 544–554.
- [130] J. Stevenson, E.Y. Huang, J.A. Olzmann, Endoplasmic reticulum-associated degradation and lipid homeostasis, Annu. Rev. Nutr. 36 (2016) 511–542.
- [131] S. Hatakeyama, M. Yada, M. Matsumoto, N. Ishida, K.-I. Nakayama, U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases, J. Biol. Chem. 276 (2001) 33111–33120.
- [132] S. Schmollinger, T. Muhlhaus, N.R. Boyle, I.K. Blaby, D. Casero, T. Mettler, J.L. Moseley, J. Kropat, F. Sommer, D. Strenkert, D. Hemme, M. Pellegrini, A.R. Grossman, M. Stitt, M. Schroda, S.S. Merchant, Nitrogen-sparing mechanisms in *Chlamydomonas* affect the transcriptome, the proteome, and photosynthetic metabolism, Plant Cell 26 (2014) 1410–1435.
- [133] J.J. Park, H. Wang, M. Gargouri, R.R. Deshpande, J.N. Skepper, F.O. Holguin, M.T. Juergens, Y. Shachar-Hill, L.M. Hicks, D.R. Gang, The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: a systems biology analysis, Plant J. 81 (2015) 611–624.
- [134] R. Satoh, K. Hagihara, R. Sugiura, Rae1-mediated nuclear export of Rnc1 is an important determinant in controlling MAPK signaling, Curr. Genet. 64 (2018) 103–108.
- [135] S. Cermelli, Y. Guo, S.P. Gross, M.A. Welte, The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot, Curr. Biol. 16 (2006) 1783–1795.
- [136] J.L. Soulages, S.J. Firdaus, S. Hartson, X. Chen, A.D. Howard, E.L. Arrese, Developmental changes in the protein composition of *Manduca sexta* lipid droplets, Insect Biochem. Mol. Biol. 42 (2012) 305–320.
- [137] Y. Yu, T. Li, N. Wu, L. Jiang, X. Ji, H. Huang, The role of lipid droplets in *Mortierella alpina* aging revealed by integrative subcellular and whole-cell proteome analysis, Sci. Rep. 7 (2017) 43896.
- [138] Y. Ding, Y. Wu, R. Zeng, K. Liao, Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse, Acta Biochim. Biophys. Sin. 44 (2012) 394–406.
- [139] H.-C. Wan, R.C.N. Melo, Z. Jin, A.M. Dvorak, P.F. Weller, Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies, FASEB J. 21 (2007) 167–178.
- [140] S. Larsson, S. Resjö, M.F. Gomez, P. James, C. Holm, Characterization of the lipid droplet proteome of a clonal insulin-producing β -cell line (INS-1 832/13), J. Proteome Res. 11 (2012) 1264–1273.
- [141] X. Yu, L. Ye, H. Zhang, J. Zhao, G. Wang, C. Guo, W. Shang, Ginsenoside Rb1 ameliorates liver fat accumulation by upregulating perilipin expression in adipose tissue of db/db obese mice, J. Ginseng Res. 39 (2015) 199–205.
- [142] M. Beller, D. Riedel, L. Jansch, G. Dieterich, J. Wehland, H. Jackle, R.P. Kühnlein, Characterization of the *Drosophila* lipid droplet subproteome, Mol. Cell. Proteomics 5 (2006) 1082–1094.
- [143] C. Lundin, R. Nordstrom, K. Wagner, C. Windpassinger, H. Andersson, G. von Heijne, I. Nilsson, Membrane topology of the human seipin protein, FEBS Lett. 580 (2006) 2281–2284.
- [144] E.M. Trentacoste, R.P. Shrestha, S.R. Smith, C. Gle, A.C. Hartmann, M. Hildebrand, W.H. Gerwick, Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110 (2013) 19748–19753.
- [145] M. Pyc, Y. Cai, M.S. Greer, O. Yurchenko, K.D. Chapman, J.M. Dyer, R.T. Mullen, Turning over a new leaf in lipid droplet biology, Trends Plant Sci. 22 (2017) 596–609.
- [146] X.L. Li, Y.F. Pan, H.H. Hu, Identification of the triacylglycerol lipase in the chloroplast envelope of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*, Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts, 33 2018, pp. 440–447.
- [147] D. Ewe, M. Tachibana, S. Kikutani, A. Gruber, C. Rio Bartulos, G. Konert, A. Kaplan, Y. Matsuda, P.G. Kroth, The intracellular distribution of inorganic carbon fixing enzymes does not support the presence of a C4 pathway in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*, Photosynth. Res. 137 (2018) 263–280.

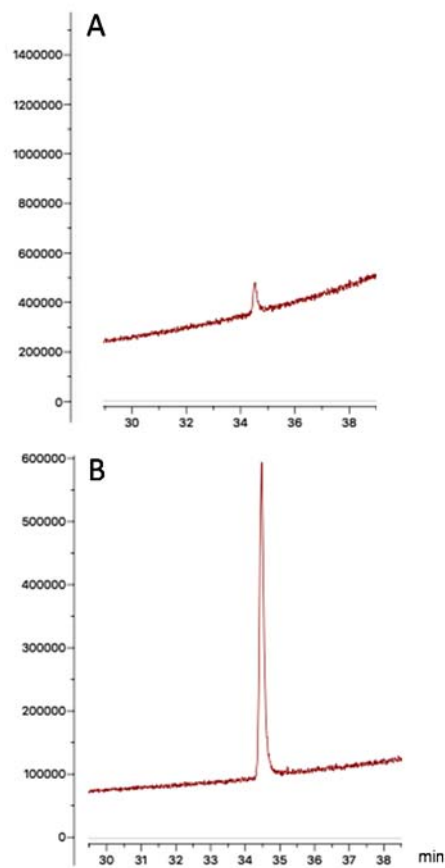
Phw3_J46287.p1	MA	Predicted protein	1174	5,502	0	Mechanohla	LD1,LD2,LD3	4	4,7	23,128	5,434.04	8,221.04	4,316.04	1,806.03	162
Phw3_J46795.p1	MA	Predicted protein	152	4,595	0		LD1	1	5,7	5,819	7,251.04	4,771.04	NAN	1,206.03	194
Phw3_J46796.p1	MA	Predicted protein	152	4,595	0		LD1	1	5,7	5,819	7,251.04	4,771.04	NAN	1,206.03	194
Phw3_E00203.p1	MA	Predicted protein	1217	4,731	3	Signal Peptide	LD1,LD2,LD3	6	5,8	43,311	4,031.04	4,691.04	3,151.04	1,181.03	196
Phw3_J46287.p1	MA	Predicted protein	276	7,767	0		LD1,LD2,LD3	2	8	13,797	4,891.04	NAN	5,111.04	1,006.03	206
Phw3_J172889.p1	MA	Predicted protein	694	6,389	0		LD2	1	1,9	6,059	1,711.04	1,361.04	3,308.04	6,591.04	228
Phw3_J172890.p1	MA	Predicted protein	694	6,389	0		LD2	1	1,9	6,059	1,711.04	1,361.04	3,308.04	6,591.04	228
Phw3_J45241.p1	MA	Predicted protein	729	7,335	0		LD1	1	1,5	5,746	4,391.04	NAN	NAN	4,391.04	235
Phw3_E001586.p1	MA	Predicted protein	1180	4,139	0		LD2	1	1,3	10,916	NAN	4,621.04	NAN	4,621.04	252
Phw3_J47072.p1	MA	Predicted protein	262	7,425	0		LD1	1	1,4	6,263	2,081.04	2,081.04	2,081.04	2,081.04	277
Phw3_E002037.p1	MA	Predicted protein	894	10,441	0		LD1	1	1,3	5,743	2,081.04	NAN	NAN	2,081.04	294
Phw3_J47533.p1	MA	Predicted protein	341	4,675	0		LD2	1	3,5	5,766	NAN	2,101.04	NAN	2,101.04	299
Phw3_J47534.p1	MA	Predicted protein	341	4,675	0		LD2	1	3,5	5,766	NAN	2,101.04	NAN	2,101.04	299
Phw3_J47702.p1	MA	Predicted protein	604	5,211	1		LD2	1	1,8	6,041	NAN	1,911.04	NAN	1,911.04	299
Phw3_J46914.p1	MA	Predicted protein	1086	6,391	0		LD3	1	0,7	6,604	NAN	2,971.05	1,166.04	1,466.04	307
Phw3_J17284.p1	MA	Predicted protein	979	8,391	0		LD3	1	1,5	5,975	NAN	3,371.04	3,261.04	6,631.04	231
Phw3_J45767.p1	MA	Predicted protein	4426	7,582	0		LD3	1	0,4	5,667	2,971.05	NAN	1,711.04	2,011.04	236

The architecture of lipid droplets the diatom *Phaeodactylum tricorutum*

Josselin Lupette, Antoine Jaussaud, Khawla Seddiki, Sabine Brugière, Hubert Schaller, Marcel Kuntz, Jean-Luc Putaux, Pierre-Henri Jouneau, Fabrice Rébeillé, Denis Falconet, Yohann Couté, Juliette Jouhet, Marianne Tardif, Juliette Salvaing, Eric Maréchal

-

Supplemental Figure



Supplemental Figure S1: Gas chromatography coupled to mass spectrometry analysis of the sterol composition of highly purified lipid droplets from *Phaeodactylum*. A, Total ion chromatogram of the free sterol fraction; B, Total ion chromatogram of an authentic brassicasterol standard.

Chapitre 5 :
Étude fonctionnelle de la
protéine CGI-58 chez
Phaeodactylum tricornutum

1. Introduction

La protéine CGI-58 (Comparative Gene Identification 58) est une α/β hydrolase fréquemment identifiée dans les protéomes des gouttelettes lipidiques des modèles de mammifère (Bartz et al., 2007, Brasaemle et al., 2004, Ulmauf et al., 2004, Orban et al., 2011, Bouchoux et al., 2011, Moessinger et al., 2011, Wan et al., 2007, Zhang et al., 2011, Larsson et al., 2012, Dahlhoff et al., 2015, Wang et al., 2015, Crunk et al., 2013). Une mutation du gène *cgi-58* est responsable du syndrome de Chanarin-Dorfman, une maladie autosomale récessive rare (60 cas dans le monde) provoquant l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes conduisant à une stéatose hépatique (Gupta & Kaur, 2005). Chez les mammifères, CGI-58 est localisée à la surface des gouttelettes lipidiques et est notamment impliquée dans le mécanisme de lipolyse (Cf. **Données Bibliographiques Partie 3**). Chez les plantes supérieures, CGI-58 est localisée au niveau du peroxyosome et interagit avec le transporteur peroxyosomal des acides gras, PXA1 (Park et al., 2013). Une première étude fonctionnelle de CGI-58 a été réalisée au laboratoire en support à un brevet, et suggère un rôle dans le contrôle de la teneur en TAG (Leterrier et al., 2015). Toutefois, cette étude ne repose que sur l'analyse d'un clone transformé avec une construction visant à diminuer l'expression du gène codant pour CGI-58 sans que le niveau d'expression ait été effectivement contrôlé, par exemple par RT-qPCR. La protéine CGI-58 n'a pas été identifiée dans le protéome de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum* (Chapitre 4). Toutefois, elle pourrait jouer un rôle dans le processus de remobilisation des acides gras issus des TAGs. Nous avons donc entrepris de réévaluer la fonction possible de CGI-58 chez *Phaeodactylum* par une approche de génomique fonctionnelle, par expression de constructions anti-sens.

2. Mise en place de lignés anti-sens

2.1. Construction

Phaeodactylum présente un seul homologue pour le gène *cgi-58* (Leterrier et al., 2015). Une construction anti-sens du gène CGI-58 (genbank XM_002183547 / Phatrdraft 54974) de *Phaeodactylum* a été réalisée dans le vecteur PH4-AS_MCS-II (**Figure 67**) (De Riso et al., 2009). Un fragment du gène amplifié par PCR (436 pb) à l'aide d'amorces complétées de sites de restriction (EcoRI et XbaI) a été introduit dans le vecteur PH4-AS_MCS-II pour une expression anti-sens.

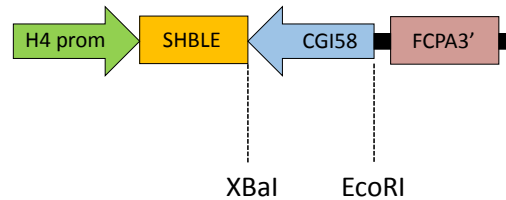


Figure 67 : Schématisation de la construction de l'anti-sens CGI-58 chez *Phaeodactylum*. Le clonage a été réalisé dans le vecteur PH4 possédant un promoteur H4 (en vert), une cassette de résistance à la zéocine (SHBLE en orange) et un terminateur FCPA (en rouge).

La transformation de cellules de *Phaeodactylum* a été réalisée par biolistique comme décrit dans le Matériel et Méthodes. Après trois semaines de culture sur milieu avec pression de sélection (antibiotique : zéocine), huit clones ont été obtenus.

2.2. Expression génique

Avant d'initier l'étude de l'expression du gène cible *cgi-58*, il était nécessaire de vérifier l'efficacité d'hybridation des primers par RT-qPCR utilisés pour l'amplification à l'aide d'une gamme étalon d'ADN génomique. Les résultats sont présentés **Figure 68**. Cette étude nous a permis de calculer une efficacité de 93% pour les primers de *cgi-58* (**Figure 68A**), de 111 % pour H4 (**Figure 68B**), de 110 % pour HPRT (**Figure 68C**) et de 103% pour RPS (**Figure 68D**). Les primers ont donc été considérés utilisables pour vérifier le niveau d'expression génique des clones obtenus par transformation avec les constructions anti-sens. Nous avons considéré HPRT et H4 comme gènes de ménage pour normaliser les niveaux d'expression mesurés. L'analyse de l'expression de *cgi-58* pour chacun des clones obtenus est représentée dans la **Figure 69**. Les lignées transformées ont été remises en culture en plaque 24 puits afin d'extraire l'ARN avant retro-transcription en ADNc. Parmi les huit transformants, les lignées CGI-58-AS1, CGI-58-AS2 et CGI-58-AS5 présentent respectivement une diminution d'expression de 81,3%, 78,8% et 86,6% pour le gène codant pour la protéine CGI-58.

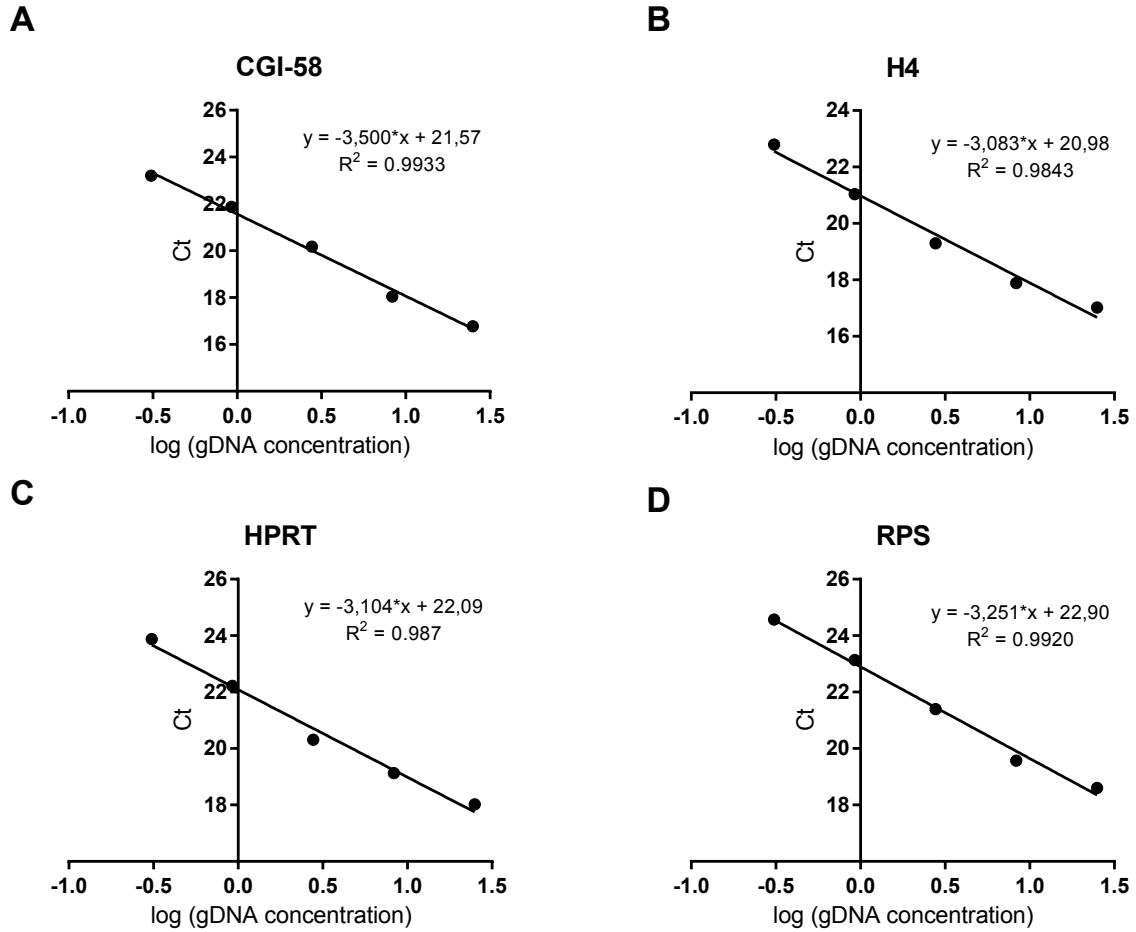


Figure 68 : Analyses de l'efficacité des primers de qPCR pour le gène cible CGI-58 (A) ainsi que pour les gènes de ménage H4 (B), HPRT (C) et RPS (D).

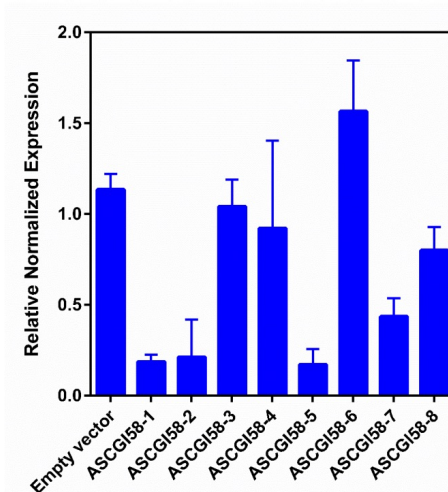


Figure 69 : Expression génique des lignées transformées avec une construction anti-sens du gène de CGI-58 obtenues par biolistique.

3. Etudes physiologiques des lignées anti-sens CGI-58-AS1, AS2 et AS5

3.1. Cultures en condition normale (ESAW 10N10P)

La croissance des clones exprimant des constructions anti-sens du gène *cgi-58* a été suivie, pendant 7 jours en conditions normales de culture, en parallèle de contrôles sauvages (WT) et de lignées transformées avec le vecteur vide (Empty Vector). Aucune différence significative n'a été détectée en terme de croissance et d'accumulation de lipides neutres entre les contrôles et les mutants anti-sens (**Figures 70A et 70B**). Ces résultats sont similaires avec ceux du clone C1_10, de la précédente étude fonctionnelle, concernant la croissance cellulaire (Leterrier et al., 2015). Nous n'observons pas de marquage plus important des cellules par le rouge de Nil. L'analyse par microscopie à épifluorescence ne révèle pas la présence de gouttelettes lipidiques. L'évolution de la capacité photosynthétique est similaire entre les lignées anti-sens et les lignées contrôles (**Figure 70C**). Après 7 jours de croissance, la concentration en chlorophylle a, déterminée par spectrophotométrie, n'est pas significativement différente entre les contrôles (WT et Empty Vector) et les clones anti-sens (CGI-58-AS1, CGI-58-AS2, CGI-58-AS5) (**Figure 70D**). Aucune différence physiologique n'a donc été observée entre les conditions contrôles et mutantes en condition de culture normale (ESAW 10N10P).

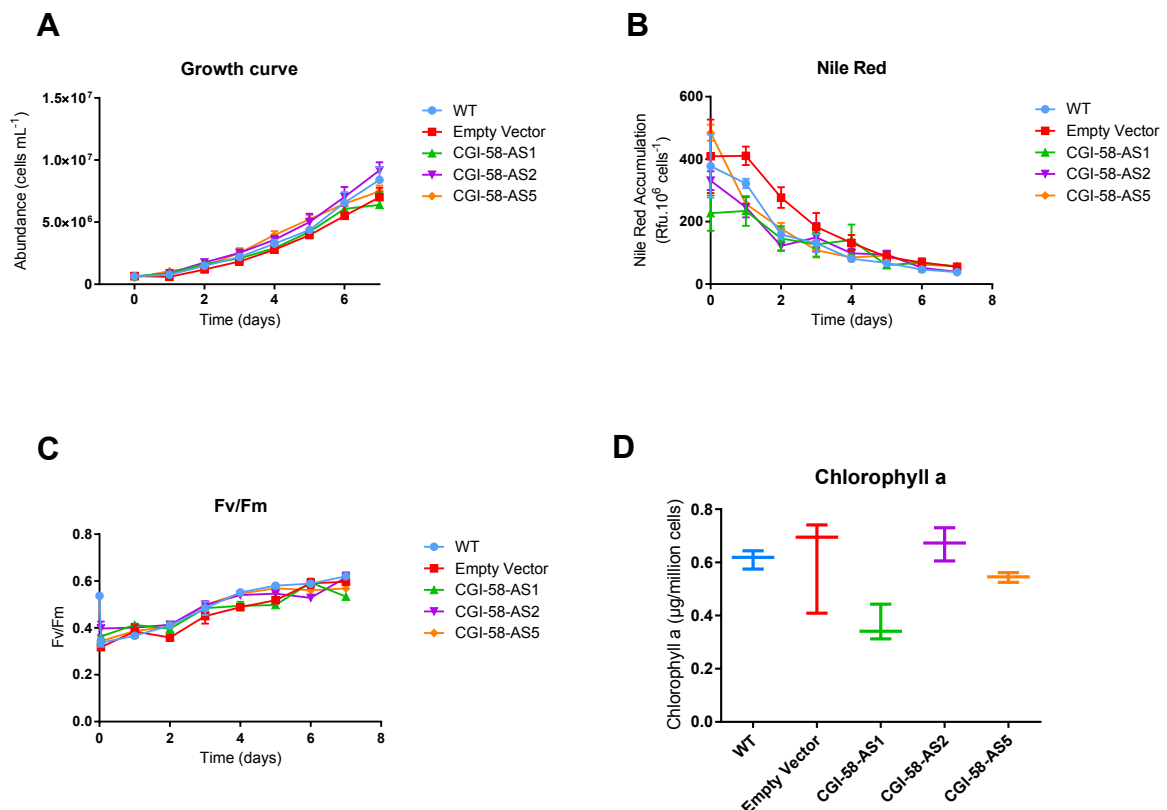


Figure 70 : Analyses physiologiques de lignées de *Phaeodactylum* sauvages (WT), transformées avec un vecteur « vide » (Empty vector) et des constructions anti-sens

CGI-58 cultivées en conditions normales de croissance (ESAW 10N10P). Les analyses ont été réalisées pendant 7 jours. **A :** Concentration cellulaire mesurée par l'absorbance à 730 nm comme décrit dans Conte et al., 2018. **B :** **Evaluation de l'accumulation de lipides neutres par marquage au Rouge de Nil.** **C:** **Détermination de la capacité photosynthétique du photosystème II (Fv/Fm) au cours du temps.** **D :** **Evaluation de la concentration de Chlorophylle a.** La chlorophylle a été extraite comme décrit dans le matériel et méthodes et évaluée par spectrophotométrie. La quantité de chlorophylle a a été normalisée avec la concentration cellulaire au 7^{ème} jour. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type par rapport à la moyenne (n=3). Bleu, WT ; rouge, Empty vector ; Vert, Violet et Orange, trois lignées anti-sens.

Une étude de la composition en acides gras totaux a été réalisée au septième jour de culture par GC-FID (**Figure 71**). Après 7 jours de croissance, le profil des acides gras totaux présente une augmentation significative du C16:1 pour le mutant anti-sens CGI-58-AS5 par rapport au vecteur vide (p-value < 0.01). Une diminution significative du C20:5 est également observée pour les trois mutants par rapport au vecteur vide. Une diminution du C20:5 est généralement observée en carence d'azote chez *Phaeodactylum*, coïncidant avec une baisse relative des glycérolipides plastidiaux riches en C20:5 et une augmentation concomitante de TAG riche en C16:1 (Abida et al., 2015). On peut donc supposer que la diminution du C20:5 et l'augmentation du C16:1 reflètent une augmentation de la synthèse de gouttelettes lipidiques et que CGI-58 peut en effet être impliqué dans un mécanisme de lipolyse chez *Phaeodactylum*.

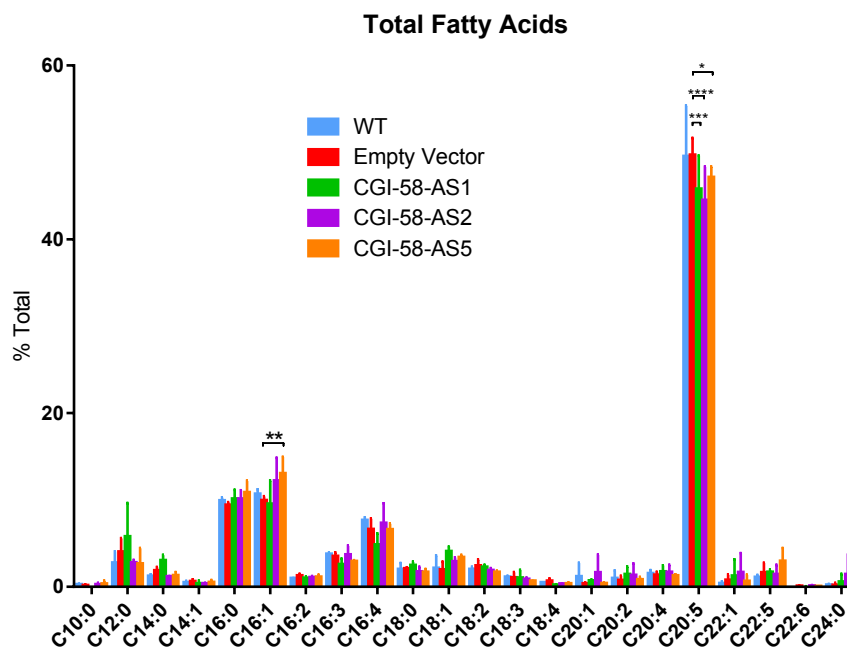


Figure 71 : Profil des acides gras totaux de lignées de *Phaeodactylum* sauvage (WT), transformées avec un vecteur « vide » (Empty vector) et des constructions anti-sens CGI-58 (CGI-58-AS1 CGI-58-AS2 et CGI-58-AS5) cultivées en condition normale de croissance (ESAW 10N10P). Les glycérolipides ont été extraits et les acides gras totaux ont été analysés, par séparation des méthyl-esters d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Les barres d'erreurs correspondent

à l'écart type par rapport à la moyenne (n=3). * : p< 0,05, ** : p< 0,01, *** : p<0,001 et **** : p < 0,0001 (ANOVA à deux facteurs). Bleu, WT ; Rouge, Empty vector ; Vert, Violet et Orange, trois lignées anti-sens.

3.2. Cultures en carence d'azote (ESAW 00N10P)

Une étude physiologique a été réalisée en carence d'azote pendant 6 jours (**Figure 72**). Les mutants anti-sens présentent une vitesse de croissance plus lente que les contrôles WT et Empty Vector (**Figure 72A**). En parallèle, une accumulation de lipides neutres (facteur 2,5) est observée. L'augmentation du marquage par le rouge de Nil est non significativement différente entre les contrôles et les mutants pendant les 6 jours de carence en azote (**Figure 72B**). Cependant, nous pouvons observer que les trois lignées anti-sens présentent un marquage au rouge de Nil plus important au 4^{ème} jour de carence par rapport au WT et au vecteur vide. L'accumulation de lipides neutres semble corrélée à une diminution de la capacité photosynthétique du photosystème II (Fv/Fm) et une diminution d'un facteur 6 de la quantité de chlorophylle a par rapport à la condition normale de croissance (ESAW 10N10P), signifiant un dysfonctionnement de la machinerie photosynthétique (**Figures 72C et 72D**).

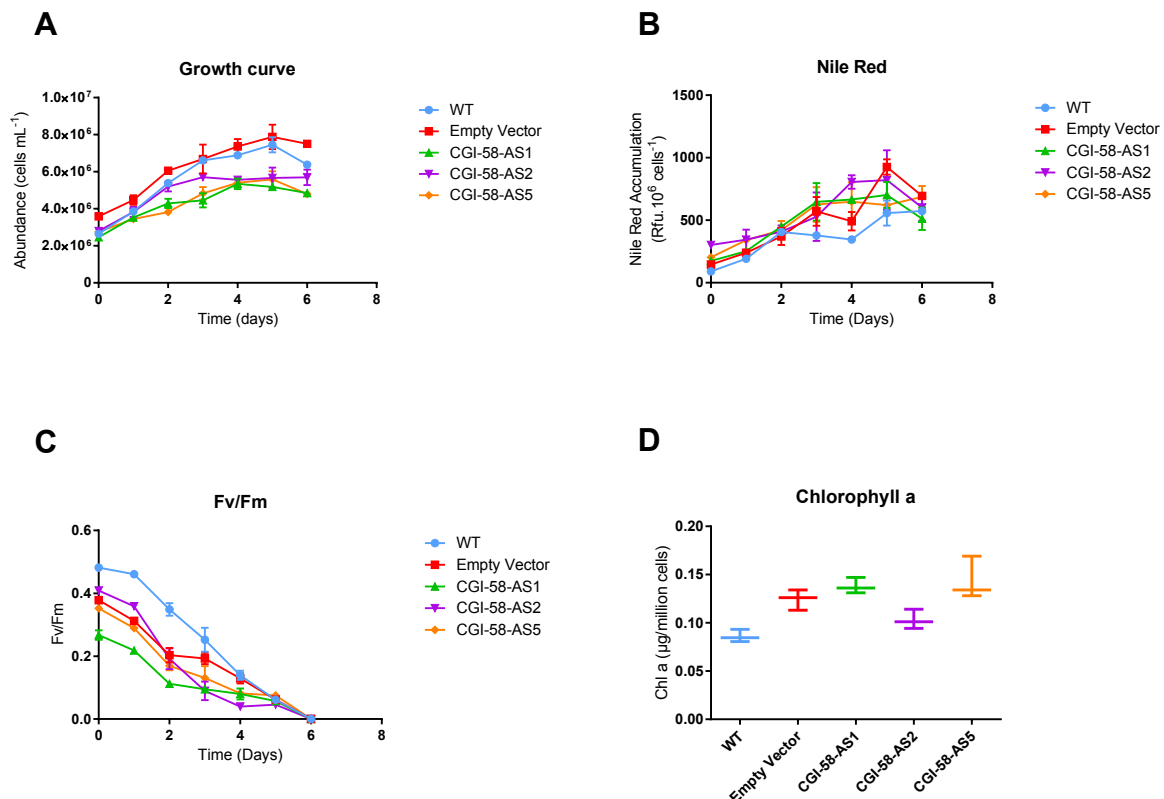


Figure 72 : Analyses physiologiques de lignées de *Phaeodactylum* sauvages (WT), transformées avec un vecteur « vide » (Empty vector) et des constructions anti-sens CGI-58 (CGI-58-AS1, CGI-58-AS2 et CGI-58-AS5) cultivées en carence d'azote (ESAW 00N10P). Les analyses ont été réalisées pendant 7 jours. A, concentration cellulaire mesurée par absorbance à 730 nm comme décrit dans Conte et al., 2018. B, évaluation de l'accumulation de lipides neutres par marquage au Rouge de Nil. C, détermination de la capacité photosynthétique du photosystème II (Fv/Fm) au cours du temps. D,

évaluation de la concentration de Chlorophylle a. La chlorophylle a été extraite comme décrit dans le matériel et méthodes et évaluée par spectrophotométrie. La quantité de chlorophylle a été normalisée par rapport à la concentration cellulaire au 6^{ème} jour de carence en azote. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type par rapport à la moyenne (n=3). Bleu, WT ; Rouge, Empty Vector ; Vert, Violet et Orange, trois lignées anti-sens.

Une analyse de la composition en acides gras totaux a été réalisée au sixième jour de carence en azote par GC-FID (**Figure 73**). Aucune différence significative n'a été observée après six jours de carence entre les conditions contrôles (WT et Empty vector) et les trois mutants anti-sens CGI-58. Le profil des acides gras totaux présente une augmentation de la proportion en C16:0, C16:1 et une diminution de la proportion de C20:5 par rapport à la **Figure 71**. Ces résultats indiquent un remodelage lipidique en carence d'azote et sont également cohérents avec des études précédemment publiées chez *Phaeodactylum* (Abida et al., 2015, Jouhet et al., 2017). Il serait intéressant de répéter cette analyse au quatrième jour de carence en azote afin de vérifier si la différence observée dans la composition en acide gras des lignées anti-sens par rapport aux contrôles pourrait en effet être liée à un état particulier lorsque l'azote vient à manquer.

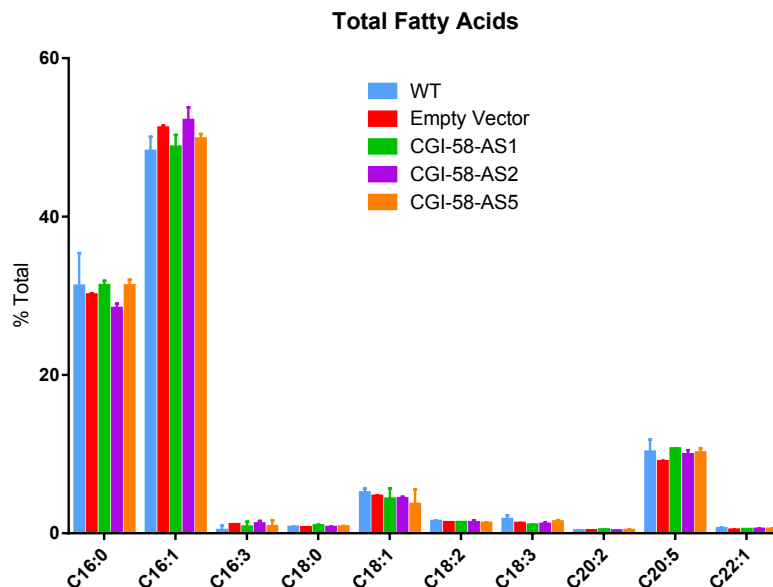


Figure 73 : Profil des acides gras totaux de lignées de *Phaeodactylum* sauvages (WT), transformées avec un vecteur « vide » (Empty Vector) et des constructions anti-sens CGI-58 (CGI-58-AS1, CGI-58-AS2 en violet et CGI-58-AS5) cultivées en carence d'azote (ESAW 00N10P). Les glycérolipides ont été extraits et les acides gras totaux ont été analysés, par séparation des méthyl-esters d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type par rapport à la moyenne (n=3). Bleu, WT ; Rouge, Empty Vector ; Vert, Violet et Orange, trois lignées anti-sens.

4. Conclusion et perspectives d'études

Ce chapitre est consacré à une étude fonctionnelle de la protéine CGI-58. Pour cela, trois lignées anti-sens (CGI-58-AS1, CGI-58-AS2 et CGI-58-AS5) ont été construites et analysées. En condition normale de croissance (ESAW 10N10P), un remodelage lipidique est observé au niveau du C16:1 et du C20:5 chez les lignées anti-sens après 7 jours de croissance en comparaison du sauvage et du vecteur vide transformé. En carence d'azote, ce type de résultats est généralement observé lors de l'accumulation de TAG sous forme de gouttelettes lipidiques (Abida et al., 2015, Jouhet et al., 2017). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que CGI-58 pourrait être impliqué dans le mécanisme de dégradation des TAGs chez *Phaeodactylum*. Il serait intéressant à l'avenir de compléter cette analyse par un profilage des glycérolipides des trois lignées anti-sens, par LC-MS/MS. De surcroît, avec le développement des outils génétiques chez *Phaeodactylum*, il est désormais envisageable de mettre en place une lignée *knock-out* à l'aide du système CRISPR/Cas9, pour ce gène chez *Phaeodactylum*. Une perte de fonction de *cgi-58* provoque l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les feuilles (James et al., 2010, Ghosh et al., 2009). Une étude comparative entre les résultats obtenus pendant cette thèse et des lignées KO pourrait donner des pistes d'études sur la fonction de CGI-58. De surcroît, nous avons développé un anticorps contre la protéine CGI-58, au cours de cette thèse, pouvant permettre la validation de mutants d'expression.

Une seconde hypothèse possible est le rôle de CGI-58 dans le mécanisme de synthèse de l'acide eicosapentaénoïque (C20:5, EPA). En effet, la diminution du C20:5 observée dans les trois lignées anti-sens pourrait correspondre à une altération de la voie d'élongation et de désaturation des acides gras au niveau du réticulum endoplasmique (Mühlroth et al., 2013, Dolch & Maréchal, 2015, Zulu et al., 2018). Fait intéressant, nous pouvons remarquer une accumulation plus importante du C18:1 dans les trois lignées anti-sens par rapport aux contrôles en condition normale de croissance. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'un dysfonctionnement de la $\Delta 12$ désaturase, rajoutant une désaturation pour former du C18:2 (Phatr3_25769) (Domergue et al., 2003, Dolch & Maréchal, 2015). Une étude transcriptomique des lignées anti-sens et KO pourrait être intéressante pour valider cette hypothèse et pour avoir une vue d'ensemble des régulations géniques en absence de CGI-58.

L'étude des lignées anti-sens en carence d'azote n'apporte pas d'indices complémentaires hormis un marquage au rouge de Nil plus important par rapport aux contrôles au 4^{ème} jour de carence en azote.

Dans la **Partie bibliographique**, nous avons pu constater que CGI-58 s'impose comme une cible intéressante pour maîtriser la production de TAG dans de nombreux modèles d'études. Cette protéine présente la spécificité d'être localisée sur la gouttelette lipidique chez les mammifères et sur le peroxysome chez les plantes (Park et al., 2013). Une mutation de *cgi-58* chez les mammifères est responsable de la maladie de Chanarin-Dorfman. Le chapitre 4, consacré à la dissection de l'architecture de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum*, a permis de montrer que CGI-58 n'était pas localisée à la surface de la gouttelette lipidique. Ce résultat a été obtenu par une analyse protéomique de la gouttelette lipidique et confirmé par l'absence d'immunodétection de la protéine avec un anticorps anti-CGI58 dans la fraction protéique purifiée. Ainsi, se pose la question de la localisation de CGI-58. *Phaeodactylum* étant un organisme photosynthétique, nous pouvons émettre l'hypothèse que CGI-58 soit localisé au niveau du peroxysome comme c'est le cas chez *Arabidopsis thaliana* (D'Andrea, 2015). Pour vérifier cette hypothèse, une perspective possible serait d'étudier le protéome du peroxysome isolé de *Phaeodactylum*. Un protocole a été récemment publié chez *Arabidopsis thaliana* pour étudier le protéome des peroxysomes de feuilles sénescents (Pan et al., 2018). Des mises au point seront nécessaires pour adapter la méthodologie à *Phaeodactylum* notamment au niveau des conditions de cultures. Cette approche omique apporterait une vue d'ensemble des protéines impliquées dans le mécanisme de dégradation des acides gras chez *Phaeodactylum*. Les enzymes impliquées dans la β -oxydation (Transporteur ABC, ECH, etc.) pourraient être utilisées comme contrôle positif de l'analyse protéomique. En parallèle de l'étude de l'architecture de la gouttelette lipidique, nous avons développé également un anticorps anti-PEX3 (Peroxisomal biogenesis factor 3), qui est un marqueur du peroxysome et qui pourra être utilisé comme contrôle positif de la purification. Une approche plus simple serait de mettre en place une lignée CGI-58-eGFP afin d'en déterminer la localisation dans la microalgue. Cette lignée pourra notamment être employée pour suivre la localisation de CGI-58, par microscopie confocale, sur l'intégralité de la courbe de croissance. Il serait ainsi possible d'évaluer si la localisation de CGI-58 est restreinte à un organe ou est modulable au cours de la croissance de *Phaeodactylum*.

Chez les plantes, CGI-58 est également impliquée dans la libération d'acides gras pour la synthèse d'acide jasmonique (JA), une oxylipine (Park et al., 2013). Nous avons observé que *Phaeodactylum* synthétisait des isoprostanoïdes correspondant à la peroxydation d'acide gras par un mécanisme non-enzymatique (Chapitre 3). La protéine CGI-58 est-elle impliquée dans la libération d'acide gras pour la synthèse d'isoprostanoïdes chez *Phaeodactylum*? Les précurseurs des isoprostanoïdes sont toujours présents chez les lignées anti-sens, signifiant que la synthèse d'isoprostanoïdes est possible sans CGI-58. Il serait intéressant de

mesurer la quantité d'isoprostanoïdes synthétisés chez les lignées anti-sens et chez les futures lignées KO afin de répondre à cette question.

Discussion Générale & Conclusion

1. Induction de la formation de gouttelettes lipidiques chez *Phaeodactylum*

La formation de gouttelettes lipidiques constitue, depuis une trentaine d'années, un sujet de recherche important aussi bien sur le plan fondamental pour la compréhension des mécanismes de biogenèse et de dégradation, que sur un plan biotechnologique notamment pour l'intérêt que présentent les TAG pour de nombreuses applications (nutrition, chimie verte, biocarburants) (Lupette & Maréchal, 2018) ou comme modèle pour certaines pathologies par l'étude de protéines spécifiques dont des mutations sont responsables de maladies rares chez l'homme (Seipin, CGI-58).

De manière générale, l'induction des gouttelettes lipidiques est liée à un stress chez l'ensemble des modèles d'études présentés dans la **Partie 2** des données bibliographiques. Chez les microalgues, les gouttelettes lipidiques s'accumulent notamment lors de stress environnementaux (abiotiques) tels qu'une carence en azote ou en phosphate (Nguyen et al., 2011, Abida et al., 2015, Popko et al., 2016), une forte luminosité (Alboresi et al., 2016) ou une variation de température (Yao et al., 2012, Alboresi et al., 2016). Ces stress sont responsables d'un arrêt de la croissance cellulaire, une diminution de l'activité photosynthétique, une diminution de la synthèse de protéines et un arrêt de l'accumulation de biomasse. Ce dernier point est notamment un problème important pour les industries exploitant les microalgues pour produire des biocarburants. Les premières stratégies qui ont été mises en place pour pallier ce problème par des approches d'ingénierie génétiques concernent une modification de la voie de Kennedy sans forcément tenir compte du fonctionnement global du métabolisme.

Il convient donc de trouver de nouvelles stratégies pour favoriser l'accumulation de gouttelettes lipidiques chez les microalgues tout en préservant la croissance cellulaire. L'exploitation de petites molécules (génétique chimique) présente des similarités intéressantes avec l'ingénierie génétique car elle permet d'altérer la fonction de protéines d'une voie de synthèse ou de signalisation. Dans le cadre de cette thèse, j'ai contribué à un projet de criblage de petites molécules visant à favoriser l'accumulation de TAG chez *Phaeodactylum* tout en maintenant une croissance cellulaire. Cette approche est intéressante car elle permet d'une part d'identifier des composés qui permettent d'induire l'accumulation de TAG sans carence nutritionnelle, mais également de faire un inventaire des voies métaboliques pouvant être impliquées dans la synthèse des TAGs chez *Phaeodactylum*. Par cette approche, nous avons identifiés 34 composés favorisant la production de TAG, potentiellement impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires : le métabolisme des stérols, l'activation ou l'inhibition de récepteurs et de transporteurs membranaires, la division cellulaire, ainsi que la modulation de voies de signalisation (nucléotides cycliques et oxylipines). L'article 1 s'est focalisé sur le métabolisme des stérols

à travers l'étude du 17 α -éthynylestradiol. Les analyses lipidomique et transcriptomique nous ont permis de mettre en lumière que l'addition de cette molécule induisait une perturbation de la voie de synthèse des stérols. Les stérols et les TAGs présentent un précurseur commun : l'acétyl-CoA. Le traitement avec le 17 α -éthynylestradiol provoque très vraisemblablement une réallocation du carbone des stérols vers les TAGs, mettant ainsi en évidence un mécanisme compétitif possible entre les deux voies métaboliques.

Les articles 2 et 3 de cette thèse se sont focalisés sur l'étude des deux voies de signalisation détectés dans le crible de l'article 1, impliquant potentiellement des nucléotides cycliques et des oxylipines. L'article 2 s'intéresse aux effets du monoxyde d'azote, composé connu pour être un activateur des nucléotides cyclases (Francis et al., 2010). L'article 3 se focalise, quant à lui, sur la détection d'oxylipines synthétisés de façon non-enzymatique chez *Phaeodactylum*. Le **Tableau 15** résume les effets observés sur le métabolisme des glycérolipides pour les différents traitements utilisés (17 α -éthynylestradiol et H₂O₂) ou la surexpression d'un gène codant pour une NO-associated protein (NOA) chez *Phaeodactylum*. L'induction de la synthèse des TAG, sous forme de gouttelettes lipidiques, par ces différents traitements implique une régulation différente du métabolisme des glycérolipides. Le NO[•] est responsable d'une inhibition partielle des MGD synthèses, provoquant une diminution de la synthèse de MGDG et une accumulation de TAG par un mécanisme de reprogrammation transcriptionnelle. Le peroxyde d'hydrogène provoque la peroxydation des glycérolipides conduisant à la synthèse d'isoprostanoïdes. La PC et le DGTA constituent les deux glycérolipides précurseurs des oxylipines non-enzymatique. La synthèse des TAG s'effectue à travers un mécanisme inconnu dans le cas d'une exposition aux isoprostanoïdes et du H₂O₂. Une analyse transcriptomique de *Phaeodactylum* en présence de peroxyde d'hydrogène pourra nous aider à élucider ce processus.

	17 α -éthynylestradiol	NO [•]	H ₂ O ₂
SQDG	Stable	Diminution	Diminution
MGDG	Diminution	Diminution	Diminution
DGDG	Stable	Diminution	Augmentation
PC	Augmentation	Diminution	Stable
DGTA	Stable	Diminution	Stable
TAG	Augmentation	Augmentation	Augmentation

Tableau 15 : Régulations du métabolisme des glycérolipides de *Phaeodactylum* observées dans cette thèse.

Les travaux de cette thèse ont donc permis d'avancer sur l'appréhension et la compréhension de l'impact du métabolisme des stérols et de voies de signalisation spécifiques (nucléotides cycliques et oxylipines non-enzymatique) dans le contrôle du métabolisme des TAG chez *Phaeodactylum*. Cependant, le crible de petites molécules a également permis l'identification d'autres composés agissant dans d'autres mécanismes (récepteurs et transporteurs membranaires, enzymes, processus de division cellulaire). Des études approfondies du rôle possible de ces différents processus au niveau du métabolisme des TAGs devront être menées à l'avenir chez *Phaeodactylum*.

2. Une architecture originale de la gouttelette lipidique

A l'initiation de cette thèse, les connaissances sur l'architecture de la gouttelette lipidique étaient minces. Un protéome sommaire a été publié lors de ma première année de thèse caractérisant cinq protéines majoritaires dont la Stramenopile Lipid Droplet Protein (StLDP). La StLDP est une protéine de classe I de 456 acides aminés composée d'un domaine hydrophobe de 54 acides aminés (Yoneda et al., 2016). La localisation de la StLDP a été confirmée à la surface de la gouttelette lui conférant le rôle de marqueur de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum* (Yoneda et al., 2018).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons analysé l'architecture de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum* après sept jours de carence en azote (**Figure 74**). Le glycérolipidome de la gouttelette lipidique a tout d'abord été analysé révélant 99% de TAG et une très faible proportion de MGDG indiquant un haut degré de purification. Nous n'avons pas détecté de stérol esters dans le cœur hydrophobe de la gouttelette lipidique. Un enrichissement spécifique en β -carotène (28,7 mol% de la quantité totale de pigments) a été mesuré dans la fraction purifiée. Nous proposons un modèle d'export d'une partie du β -carotène, basé sur les connaissances du modèle *Haematococcus pluvialis*, du chloroplaste vers le réticulum endoplasmique (Peled et al., 2011). Des investigations complémentaires seront nécessaires pour valider ou corriger ce modèle.

Nous avons également détecté trois autres glycérolipides dans la fraction purifiée : le DGTA (0,4 mol%), le SQDG (0,35 mol%) et la PC (0,15 mol%). De par l'absence de MGDG dans la fraction purifiée, glycérolipide majoritaire de l'extrait total, nous avons considéré que ces trois glycérolipides étaient des composants de la monocouche de lipides polaires. L'origine de ces trois glycérolipides permet d'émettre des hypothèses sur le lieu de biogenèse de la gouttelette lipidique. Le SQDG est un glycérolipide localisé dans le chloroplaste. Sa détection à la surface de la gouttelette lipidique semble indiquer que la membrane produisant la gouttelette lipidique est la membrane la plus externe du chloroplaste (EpM). Cependant, l'origine du SQDG dans l'EpM est aujourd'hui inconnue. La PC et le DGTA proviennent

vraisemblablement du réticulum endoplasmique. La **Partie 2** des données bibliographiques nous a permis de constater que la PC était un glycérolipide fréquemment rencontré dans les monocouches de lipides polaires chez les mammifères ou chez les levures (Tauchi-Sato et al., 2002, Grillitsch et al., 2011).

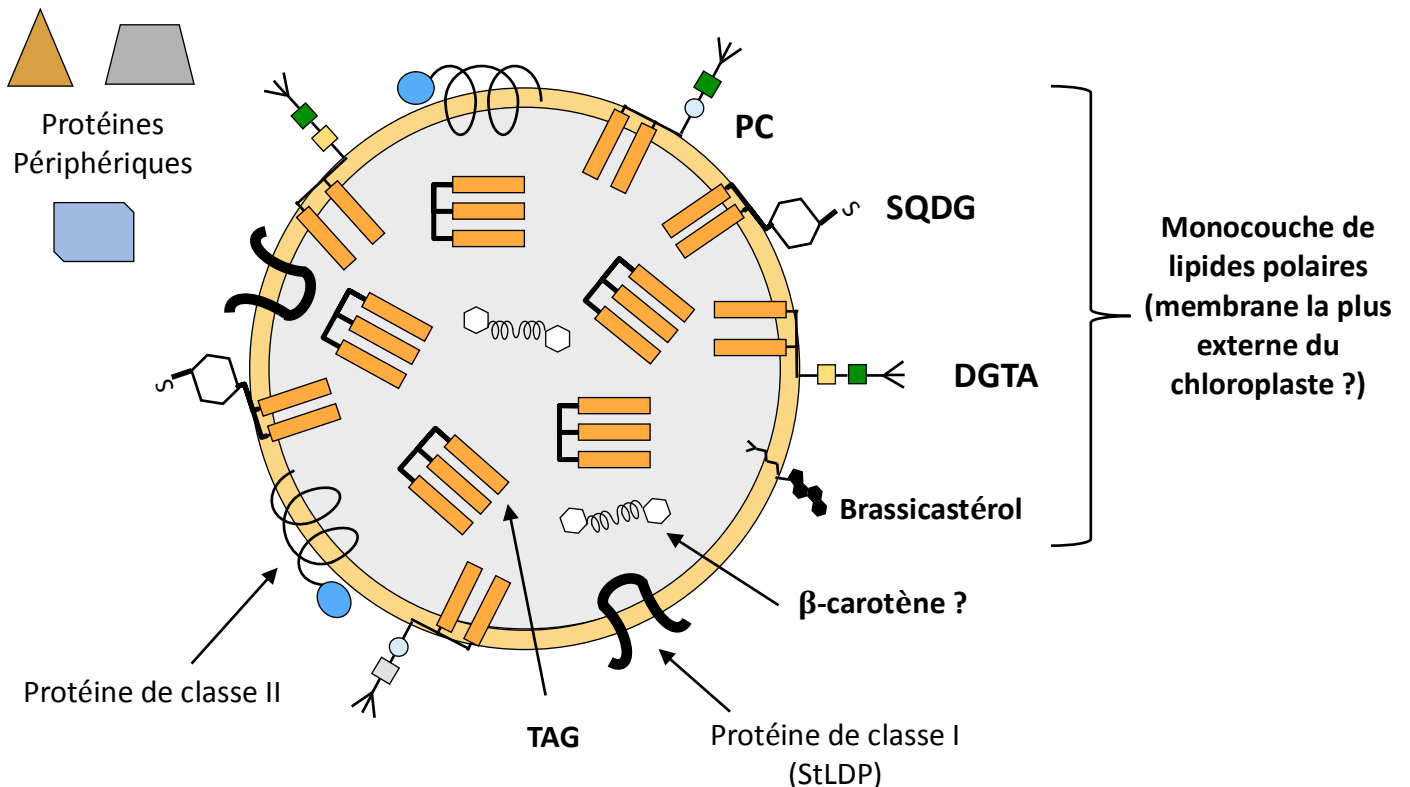


Figure 74 : Proposition d'un modèle architectural de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum*. La gouttelette lipidique est composée d'un cœur hydrophobe contenant majoritairement des triacylglycérols et des caroténoïdes en moindre proportion. La monocouche de lipides polaires est composée de phosphatidylcholine (PC), de (SQDG) et de deux espèces moléculaires de DGTA (20:5-16:1 et 20:5-16:2), spécifiques de la gouttelette lipidique. Le protéome de la gouttelette lipidique a permis la détection de 86 protéines dans la fraction purifiée.

La monocouche présente un enrichissement spécifique pour deux espèces moléculaires de DGTA (20:5-16:1 et 20:5-16:2). Le DGTA constitue une plateforme de synthèse du 20:5 chez *Phaeodactylum* contenant habituellement, dans un extrait cellulaire total, plusieurs acides gras précurseurs comme le 18:1, le 18:2 le 18:3 et le 20:4 (Abida et al., 2015). Ces acides gras précurseurs ne sont pas détectés dans les espèces moléculaires de DGTA de la monocouche de la gouttelette lipidique suggérant un tri en aval de la synthèse du 20:5. Enfin, nous avons détecté un stérol libre, le brassicastérol, représentant moins de 5 mol% du total des glycérolipides + stérols. La polarité et la proportion du brassicastérol semblent confirmer sa localisation au niveau de la monocouche de lipides polaires.

L'analyse du protéome de la gouttelette lipidique révèle 86 protéines dans la fraction purifiée. Trois des cinq protéines de la première étude protéomique (Yoneda et al., 2016) ont été détectées dans cette thèse, incluant notamment la protéine marqueur de la gouttelette lipidique : StLDP. Par immunodétection, nous avons observé un enrichissement pour la StLDP en carence d'azote ainsi que dans la fraction purifiée de gouttelette lipidique. Les 86 protéines ont été divisées en sept groupes fonctionnelles : métabolisme (19 protéines) ; organites membranaires (9 protéines) ; chaperonnes, repliement des protéines, modifications post-traductionnelles et contrôle qualité (12 protéines) ; cytosquelette (3 protéines) ; traitement de l'information génétique (15 protéines) ; plastoglobules et composants des thylakoïdes (18 protéines) et des protéines inconnues (10 protéines).

Un point intéressant de ce protéome est l'absence de détection d'enzymes de synthèse des TAG, c'est-à-dire les DGATs et les PDATs, dans le protéome de la gouttelette lipidique. Il a en effet été montré chez les mammifères que les protéines GPAT4 et DGAT2 sont initialement présentes au niveau du réticulum endoplasmique puis relocalisées vers la gouttelette lipidique (Wilfling et al., 2013). Une présence d'enzyme de synthèse à la surface d'une gouttelette lipidique suggère que la taille de la gouttelette peut être contrôlée indépendamment du processus de biogenèse au niveau du réticulum endoplasmique. Leur absence du protéome de la gouttelette chez *Phaeodactylum* semble indiquer que la régulation de la taille de cet organite est effectuée uniquement au niveau du lieu de synthèse. Nous avons vu dans la **Partie 4** des données bibliographiques que des protéines comme les Seipin diminuant l'énergie de flexion de la membrane ou une courbure de la membrane peuvent favoriser le développement de défauts hydrophobes favorisant l'accumulation de TAG. La Seipin n'a pas, non plus, été détectée en association avec la gouttelette lipidique. Ensemble, ces données suggèrent qu'après sept jours de carence, la gouttelette est dans une forme aboutie, distante de son locus de formation.

Nous avons pu voir dans les **données complémentaires**, présentées en fin de manuscrit, que différentes populations de gouttelettes lipidiques pouvaient apparaître au cours de la carence en azote notamment au quatrième jour. Nous pouvons donc nous demander si le protéome de la gouttelette lipidique est variable au cours de la carence ? Pour répondre à cette question, il serait intéressant à l'avenir de réaliser un protéome comparatif entre les temps 4 et 7 jours de carence en azote. Nous pourrions possiblement identifier des protéines spécifiques de ces deux temps et les caractériser fonctionnellement. De même, le protéome de la gouttelette lipidique est-il variable entre deux populations de gouttelettes lipidiques induites par des conditions différentes ? L'identification de protéines spécifiques de sous-population de gouttelettes lipidiques permettrait de suivre spécifiquement, à l'aide de fusions

avec des protéines fluorescentes l'évolution de chacune des sous-populations de gouttelettes lipidiques par imagerie confocale, par exemple.

3. Biogenèse de la gouttelette lipidique chez *Phaeodactylum*

Le mécanisme de biogenèse de la gouttelette lipidique est essentiellement connu chez les mammifères comme nous avons pu le voir dans la **Partie 3** des données bibliographiques. La biogenèse de la gouttelette lipidique s'effectue au niveau du feuillet externe du réticulum endoplasmique. Ce mécanisme est cependant inconnu chez *Phaeodactylum*, un endosymbionte secondaire présentant un chloroplaste à quatre membranes. Par des études de microscopie électronique, il a été montré que la membrane la plus externe du chloroplaste, ainsi que des vésicules endomembranaires et la membrane de l'enveloppe externe de la mitochondrie étaient en contact avec la gouttelette lipidique (Flori et al., 2016). Le mécanisme de biogenèse de la gouttelette lipidique chez *Phaeodactylum* peut donc présenter des spécificités par rapport au modèle classique décrit chez les mammifères. L'étude du protéome de la gouttelette lipidique semble un moyen d'avancer sur cette question.

Nous avons cherché, dans un premier temps, à savoir si les acteurs connus de la biogenèse chez les mammifères (Seipin, FIT2 ou CCT1) étaient présents mais nous n'avons pas détecté d'homologues de ces protéines dans la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum*. Par immunodétection, nous confirmons l'absence de Seipin dans la fraction purifiée. Ce résultat semble concordant avec ce qui est présenté chez les mammifères où la protéine Seipin est présentée comme une actrice des étapes initiales de biogenèse de la gouttelette en produisant des structures naissantes ou en étant impliquée dans la maturation précoce des gouttelettes lipidiques. Une surexpression de la protéine Seipin chez *Phaeodactylum* est responsable d'une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques et d'une accumulation de lipides neutres (Lu et al., 2017). Pour compléter cette étude, un mutant KO du gène codant pour la Seipin peut être construit à l'aide du système CRISPR/Cas9 chez *Phaeodactylum*. Il serait également intéressant de déterminer la localisation de la Seipin. Nous supposons une localisation au niveau du réticulum endoplasmique, comme chez les mammifères et les plantes, ou dans la membrane la plus externe du chloroplaste. Une étude de protéines fusions avec une protéine fluorescente pourra être employée pour valider ou non cette hypothèse par colocalisation avec un marqueur fluorescent du réticulum endoplasmique, tel que l'ER Tracker (Kim et al., 2018), ou la surface du plaste, dont le contour peut être déterminé à l'aide de l'autofluorescence de la chlorophylle contenue dans cet organe.

FIT2 (Fat-inducing transcript 2) est un autre acteur de la biogenèse de la gouttelette lipidique, localisé également au niveau réticulum endoplasmique chez les mammifères et les levures (Gross et al., 2011, Kadereit et al., 2008, Choudhary et al., 2015, Walther et al., 2017). Cependant, aucun homologue de FIT2 n'a été détecté chez *Arabidopsis thaliana* (Chapman et al., 2012). Par recherche d'homologie de séquence avec la protéine FIT2 humaine (numéro d'accèsion Uniprot : Q8N6M3), nous n'avons pas trouvé d'homologue de cette protéine chez *Phaeodactylum tricornutum*. FIT2 a possiblement été perdu au cours de l'évolution chez les eucaryotes entre les organismes animaux et végétaux. Cependant, la protéine FIT2 de *Mus musculus* a été exprimée dans deux modèles de plantes, *Nicotiana benthamiana* et *Arabidopsis thaliana*, montrant une augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques dans les feuilles de ces deux modèles (Cai et al., 2017). L'expression de FIT2 dans des modèles de plantes ou de microalgues oléagineuses pourrait être une stratégie intéressante pour les développements biotechnologiques visant à améliorer la productivité en huile.

Un point intéressant également est la détection de deux sous-unités du complexe COP1 parmi les 86 protéines filtrées du protéome de la gouttelette lipidique. Si on ne tient pas compte des filtres appliqués pour éliminer des séquences provenant de contaminants éventuels, quatre sous-unités du complexe COP1 ainsi que la petite GTPase ARF1 sont présentes dans le protéome de la gouttelette lipidique. La machinerie ARF1/COP1 est impliquée dans la synthèse de nano-gouttelettes et dans le ciblage d'enzymes de synthèse des TAG chez les mammifères. Une machinerie similaire pourrait donc être également présente chez *Phaeodactylum* au niveau de la gouttelette lipidique.

4. Des fonctionnalités peu explorées de la gouttelette lipidique

Les avancées récentes des technologies mises en œuvre pour les analyses protéomiques ont permis des gains importants de sensibilité de détection de protéines. S'il est donc possible de détecter des protéines mineures associées à des structures subcellulaires, la détection de contaminants éventuels est aussi accrue. Ainsi, le protéome de la gouttelette lipidique présente des acteurs dont les fonctionnalités ont été jusqu'à présent peu explorées chez *Phaeodactylum*. Dans un premier temps, ce protéome comprend des protéines impliquées dans la traduction des ARN messagers (ribosomes, facteurs d'élongation). Ce résultat est surprenant car la carence en azote est responsable d'une dégradation de la synthèse des protéines (Longworth et al., 2016). Par immunodétection, nous avons observé une absence d'expression de RAE1 en carence d'azote, une protéine d'export des ARNm du noyau vers le cytosol. Ensemble, ces résultats suggèrent l'existence d'un pool spécifique d'ARNm stocké à proximité de la gouttelette lipidique.

Nous avons également détecté l'ensemble des histones dans le protéome de la gouttelette lipidique. Comme décrit dans la **Partie 2** des données bibliographiques, des histones ont été détectées précédemment dans plusieurs études protéomiques notamment chez les arthropodes *Drosophila melanogaster* et *Manduca sexta* (Cermelli et al., 2006, Soulages et al., 2012). La localisation de ces histones au niveau de la gouttelette lipidique devra être confirmée dans l'avenir pour mieux appréhender le rôle possible de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum* dans la régulation du stock d'histones. Nous supposons que le stockage des composants du nucléosome peut permettre la préparation de la division cellulaire et la compaction de la chromatine lorsque les cellules ne sont plus stressées.

Nous avons enfin détecté également des protéines impliquées dans des mécanismes de modifications post-traductionnelles, tels que l'ubiquitination, dans le protéome de la gouttelette lipidique. Nous avons vu dans la **Partie 3** des données bibliographiques que l'ubiquitination est un mécanisme important pour l'initiation de la lipolyse des gouttelettes lipidiques chez les plantes, mais également pour le traitement des protéines mal repliées à travers la machinerie ERAD et du protéasome 26S. Plusieurs composants de la machinerie ERAD (Cdc48) et au protéasome 26S ont été également détectés suggérant l'existence d'un mécanisme de contrôle qualité des protéines à proximité de la gouttelette lipidique de *Phaeodactylum*.

5. Relocalisation de la gouttelette lipidique vers la membrane plasmique ?

Cette thèse a apporté des connaissances fondamentales sur l'architecture de la gouttelette lipidique, notamment son protéome. Un objectif à moyen terme de cette thèse était d'exploiter des protéines cibles de ce protéome pour modifier la position de la gouttelette lipidique dans la cellule et la rapprocher de la membrane plasmique. En effet, l'un des principaux problèmes de l'exploitation industrielle des microalgues oléagineuses est le coût d'extraction des huiles produites (Lupette & Maréchal, 2018). Nous avons émis l'hypothèse que l'association entre la gouttelette lipidique et la membrane plasmique pourrait fragiliser la cellule et faciliter l'extraction des gouttelettes. Nous proposons d'utiliser des protéines de fusion entre des sondes protéiques présentant la faculté de se lier avec la membrane plasmique et des protéines spécifiques de la gouttelette lipidique. Ce type de sondes protéiques a été développé chez les plantes supérieures par l'équipe d'Yvon Jaillais, co-directeur de cette thèse, à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon. Cette partie de la thèse a été supervisée par Juliette Salvaing, chargée de recherches INRA au laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale. Des essais ont tout d'abord été menés au laboratoire en amont de l'analyse protéomique avec différentes sondes fluorescentes clonées dans le vecteur pH4-AS_MCS-II (Simon et al., 2014, Simon et al., 2016) :

- 1) H4prom::mCitrine-KA1(MARK1)
- 2) H4prom::mCherry-KA1(MARK1)
- 3) H4prom::mCitrine-8K-Farn (8+)

KA1 (Kinase Associated-1) est un domaine de la protéine humaine MARK1 (une sérine-thréonine kinase) s'associant de manière non spécifique à tous les lipides anioniques (Moravcevic et al., 2010, Hammond et al., 2012). 8K-Farn (8+) est une sonde formée par l'association de 8 lysines (forte charge positive) qui permet de reconnaître les lipides anioniques de la face interne de la membrane plasmique, et d'un signal de farnésylation, qui permet son ancrage dans la membrane. Chez les plantes supérieures, cette sonde se localise spécifiquement à la membrane plasmique (Simon et al., 2016). L'objectif était dans un premier temps de pouvoir vérifier l'adressage de ces sondes, conçues pour *Arabidopsis*, au niveau de la membrane plasmique de *Phaeodactylum*. Les résultats obtenus lors de ma première année de thèse ne permettaient pas de préciser si une expression des sondes fluorescentes était observée au niveau de la membrane plasmique. Une optimisation manuelle des codons a été ensuite réalisée pour faciliter l'expression chez *Phaeodactylum*, en se basant sur les données de la Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Afin d'éviter au maximum les recouvrements de fluorescence avec la chlorophylle et la fucoxanthine, la séquence codant le fluorophore mOrange2 a été introduite en remplacement de la mCherry. Un faible signal de fluorescence a été détecté à proximité de la membrane plasmique pour la construction H4prom::mOrange2-KA1(MARK1) mais le niveau d'expression de la protéine n'a malheureusement pu être validé par immunodétection avec un anticorps anti-GFP. Nous n'avons pas réussi à détecter de signal au niveau de la membrane plasmique de *Phaeodactylum* pour la sonde 8+. La composition et la polarité de la membrane plasmique de *Phaeodactylum* étant inconnues, il est difficile de connaître le type de sonde le plus adapté.

Les travaux de relocalisation de la gouttelette lipidique vers la membrane plasmique seront poursuivis à travers la mise en place de deux nouvelles fusions :

- une fusion entre la StLDP, marqueuse de la gouttelette lipidique et SIT2 (Phatr3_J23423), un transporteur de silice localisé au niveau de la membrane plasmique, présentant 9 segments transmembranaires (Sapriel et al., 2009). Nous pensons que l'expression de cette fusion protéique pourrait former une interaction forte entre la gouttelette lipidique et la membrane plasmique, mais elle pourrait aussi entraîner une forte désorganisation interne de *Phaeodactylum*.
- une fusion entre la StLDP et MARK1 devant former une interaction plus faible entre la membrane plasmique et la gouttelette lipidique, moins susceptible d'être délétère.

Des protéines du protéome impliquées dans le trafic membranaire (petites GTPases, SNARE, Coatomer) peuvent être également des candidates intéressantes.

6. Conclusion

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire ouvre donc plusieurs pistes d'études pour avancer dans la compréhension de l'architecture subcellulaire de la gouttelette d'huile de *Phaeodactylum* et disséquer fonctionnellement des gènes codant pour des acteurs putatifs de la biogenèse et la structure de cet organite. Plusieurs stress abiotiques ont été mis en évidence conduisant à la formation de gouttelettes d'huiles, et la comparaison avec la condition la mieux connue, la carence en azote, doit maintenant être menée.

De nouvelles fonctions sont proposées pour cet organite, telles que le stockage de messagers ou de protéines (histones), la présence d'une machinerie contrôlant la qualité du repliement protéique ou une association avec certains compartiments du système endomembranaire. Des protéines de fonctions inconnues ont aussi été détectées. Des études de génomique fonctionnelle devraient permettre de mieux comprendre la spécificité et l'importance physiologique de l'association de ces composants subcellulaires à la gouttelette lipidique chez *Phaeodactylum* et chez les diatomées de façon plus générale.

Données Complémentaires :
Élaboration d'un modèle mathématique
déterministe de croissance des
populations de gouttelettes lipidiques
de *Phaeodactylum tricornutum*

1. Introduction

La **Partie 3** des données bibliographiques présente la gouttelette lipidique comme une structure dynamique. En effet, la biogenèse de cette structure, dont le principe général est conservé à travers l'arbre du vivant, est réalisée selon un mécanisme encore inconnu chez les *Heterokonta*. De plus, *Phaeodactylum* est un organisme modèle complexe présentant des connexions entre la membrane la plus externe du chloroplaste et la gouttelette lipidique (Flori et al., 2016) suscitant des interrogations. La composition de la monocouche de lipides polaires à la surface de la gouttelette lipidique suggère deux origines possibles de synthèse des gouttelettes lipidiques : la membrane la plus externe du chloroplaste car nous détectons du SQDG et le réticulum endoplasmique car nous distinguons également la présence de deux espèces moléculaires de DGTA (20:5-16:1 et 20:5-16:2) et de la PC (Chapitre 4). Cette étude complémentaire s'intéresse aux mécanismes de biogenèse de la gouttelette lipidique chez *Phaeodactylum*. Pour cela, nous avons suivi pendant 7 jours, en carence d'azote, la biogenèse des gouttelettes lipidiques par une approche *in vivo* en mesurant la taille des gouttelettes lipidiques par RMN diffusionnelle (Wu et al., 1995, Gromova et al., 2015) en parallèle d'une étude physiologique et lipidique.

Ces données constituent le travail de Master 2 d'Antoine Jaussaud, étudiant diplômé du Master « Physiology Epigenics Development cell Differentiation » (PhEDD) de l'Université Grenoble Alpes, que j'ai co-encadré avec Eric Maréchal et Marina Gromova (Institut des Nanosciences et Cryogénie – CEA Grenoble) pendant 9 mois en Master 1 et Master 2.

2. Résultats et discussion

2.1. Analyses physiologiques de *Phaeodactylum* en carence d'azote

Dans un premier temps, un suivi des paramètres physiologiques a été réalisé durant les sept jours de carence en azote (**Figure 75**). Cette expérience a été réalisée dans des flacons de 2 L, contenant 1 L de culture, afin d'avoir un nombre suffisant de cellules pour les analyses lipidiques et la détermination de la taille des gouttelettes lipidiques. La carence en azote induit une diminution de la vitesse de croissance de *Phaeodactylum* (**Figure 75A**) ainsi qu'une augmentation de la coloration par le rouge de Nil témoignant d'une accumulation de gouttelettes lipidiques (**Figure 75B**). Enfin, on observe une diminution de la capacité photosynthétique (**Figure 75C**) et une augmentation du *quenching* non photosynthétique maximal (NPQ_{max}) (**Figure 75D**) suggérant la mise en place d'un système de protection de la photosynthèse. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenu chez *Phaeodactylum* en carence d'azote (Abida et al., 2015).

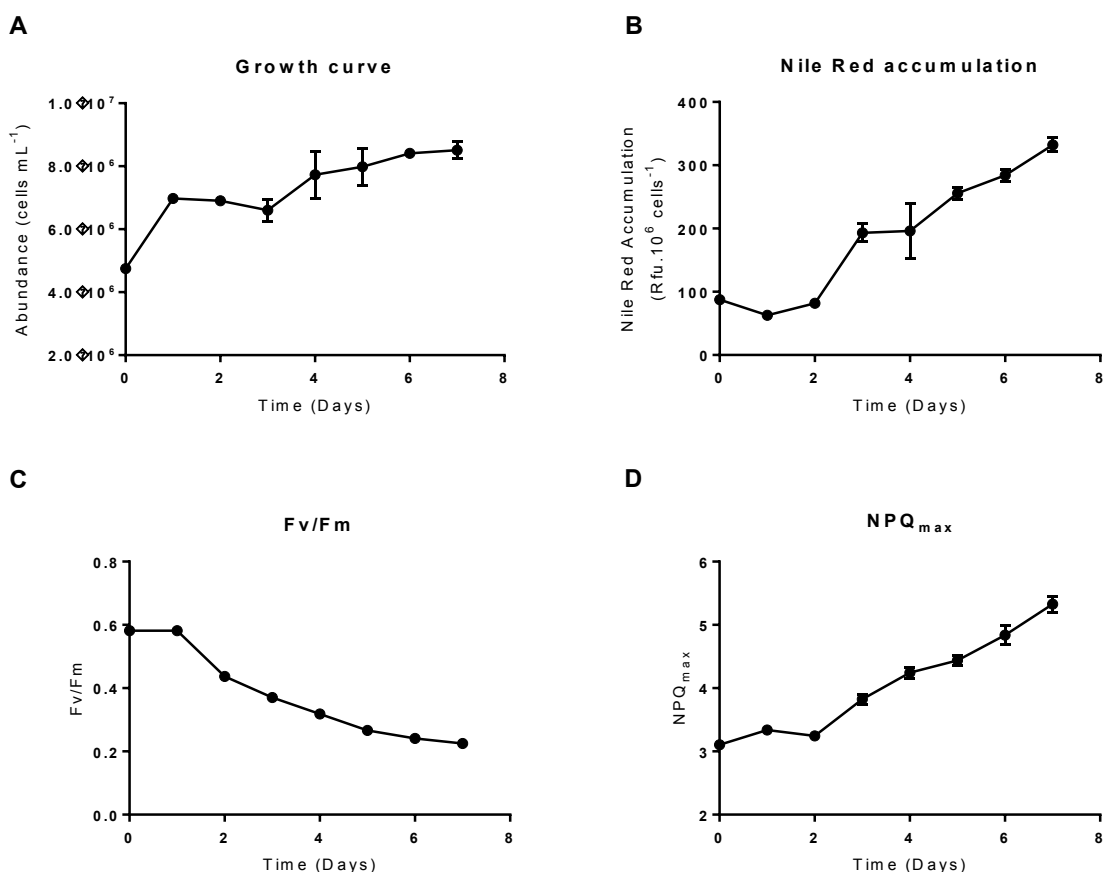


Figure 75 : Analyses physiologiques de *Phaeodactylum tricornutum* en carence d'azote. La carence d'azote a été réalisée avec un milieu ESAW 00N10P. Les cellules ont été incubées à une concentration cellulaire de 5.10^6 cellules mL⁻¹. **A, courbe de croissance de *Phaeodactylum* ; B, évaluation de l'accumulation de lipides neutres par marquage au rouge de Nil ; C, évaluation de la capacité photosynthétique (Fv/Fm) ; D, détermination du quenching non photosynthétique maximal NPQ_{max}.**

2.2. Analyses lipidiques de *Phaeodactylum* en carence d'azote

En parallèle de l'analyse physiologique, des prélèvements ont été réalisés pour suivre l'évolution des profils lipidiques au cours de la carence en azote. Une augmentation de la quantité totale des acides gras totaux est observée dans les trois premiers jours de la carence (**Figure 76A**). Une accumulation des acides gras totaux à courtes chaînes (14:0, 16:0, 16:1) est observée pendant la carence en azote suggérant une modification de la composition des glycérolipides (**Figure 76B**). L'évolution de la quantité des glycérolipides chloroplastiques (MGDG, DGDG, SQDG et PG) et des triacylglycérols (TAG) est présentée dans les **Figures 76C et 76D**. Une augmentation de la quantité des glycérolipides chloroplastiques est distinguée dans les trois premiers jours de la carence en azote. Cette augmentation pourrait correspondre à un mécanisme de secours mise en place pour protéger le chloroplaste. Ce type de réponse a déjà été décrit précédemment lors de différents stress chez *Phaeodactylum* (Abida et al., 2015, Lupette et al., sous presse). Une

diminution de la quantité des glycérolipides chloroplastiques est observée à partir du quatrième jour. En parallèle, la quantité de TAG augmente pendant la carence en azote confirmant les mesures d'augmentation du marquage par le rouge de Nil (**Figure 75B**). Ces résultats sont cohérents avec des observations réalisées par microscopies confocales (**Figure 78B**). Au quatrième jour, la photosynthèse n'est plus fonctionnelle (le ratio Fv/Fm diminue, la valeur du NPQ_{max} augmente et les teneurs en glycérolipides plastidiaux diminuent) suggérant une relocalisation des acides gras provenant des glycérolipides chloroplastiques vers la production de TAG.

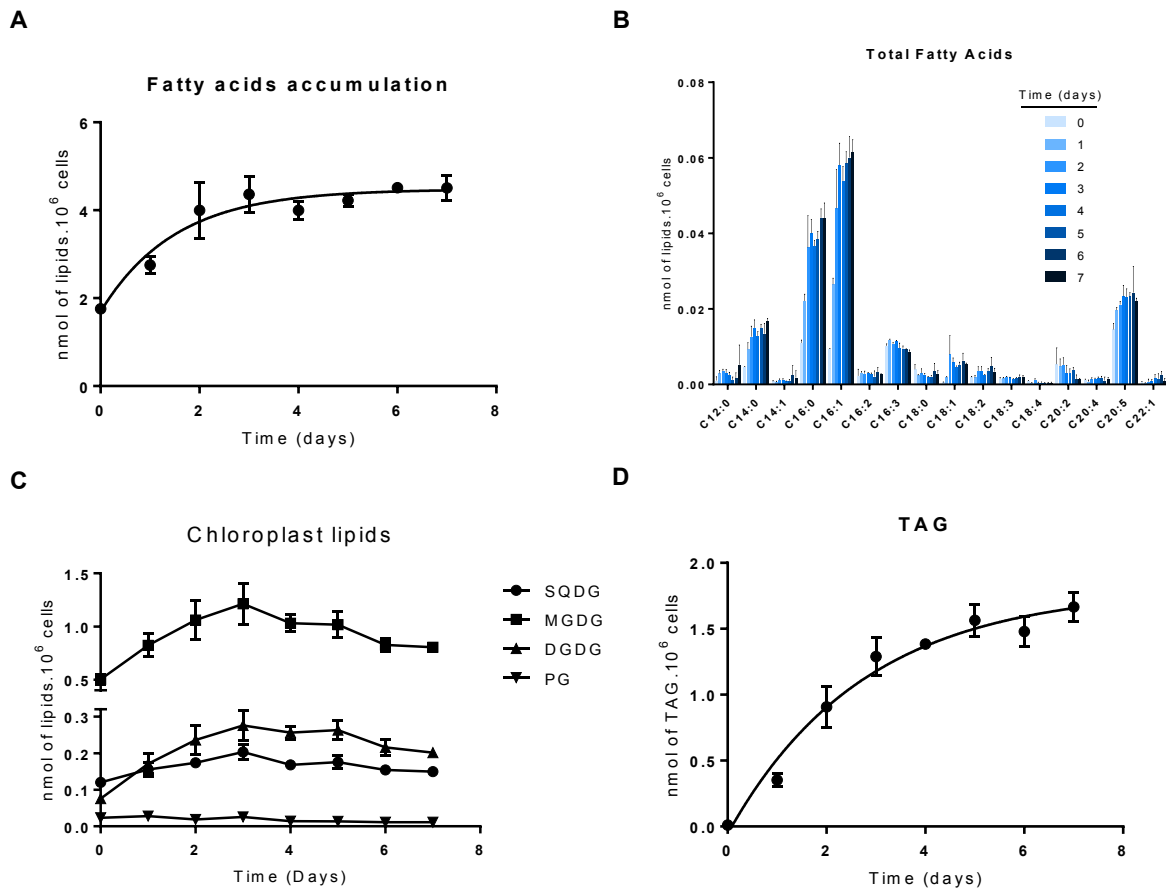


Figure 76 : Analyses lipidiques de *Phaeodactylum* en carence d'azote. A, suivi de l'accumulation des acides gras totaux de *Phaeodactylum* pendant sept jours de carence en azote. Les analyses ont été réalisées par GC-FID après extraction et méthanolyse comme décrit dans le matériel et méthodes. B, suivi de la composition des acides gras totaux de *Phaeodactylum* au cours d'une carence en azote. C, évolution des glycérolipides chloroplastiques de *Phaeodactylum* au cours d'une carence en azote. D, évolution de la quantité de TAG pendant les sept jours de carence en azote. L'ensemble des résultats est exprimé en nmol.10⁶ cells⁻¹. SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; PG, phosphatidylglycérol et TAG, triacylglycérol.

2.3. Détermination de la taille de la gouttelette lipidique

En parallèle des analyses lipidiques et physiologiques, une détermination de la taille des gouttelettes lipidiques a été réalisée au cours de la carence en azote. Antoine Jaussaud a effectué des mesures de taille de gouttelettes lipidiques observées au microscope à épifluorescence pour déterminer une taille moyenne de la gouttelette lipidique. Pour comparer ces résultats, des mesures ont été effectuées également par une approche *in vivo* par RMN diffusionnelle. La comparaison des moyennes des rayons de gouttelettes lipidiques observées par ces deux approches est présentée dans la **Figure 77**.

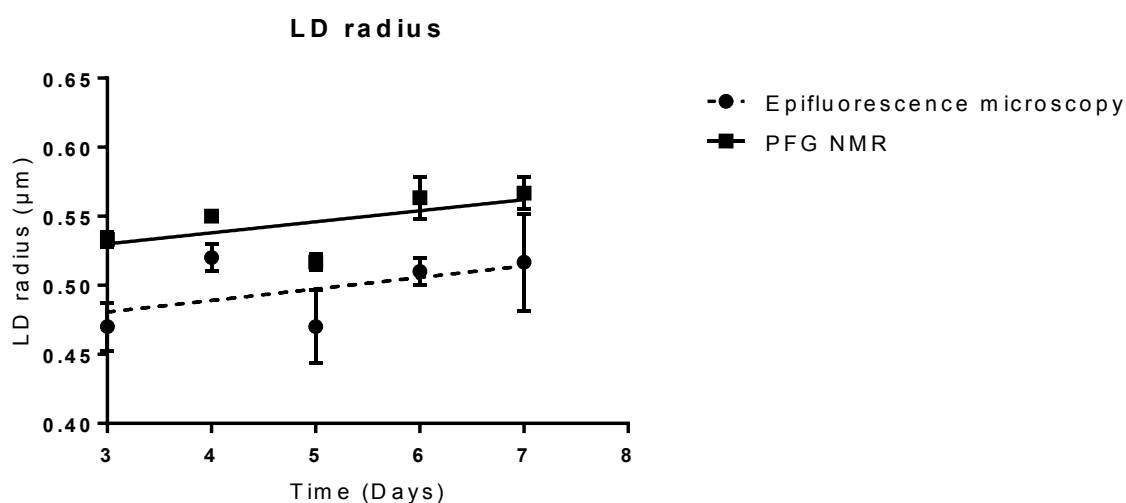


Figure 77 : Comparaison de la taille des gouttelettes lipidiques déterminée par microscopie à épifluorescence et par RMN diffusionnelle. Les méthodes de mesures des tailles de gouttelettes lipidiques sont décrites dans le matériel et méthodes. PFG NMR : *Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance*.

Une évolution similaire de la taille des gouttelettes lipidiques est mesurée par microscopie à épifluorescence après marquage par le rouge de Nil et par RMN. Ce résultat confirme que la méthode RMN est fiable pour déterminer une taille moyenne de gouttelettes lipidiques. La diminution de la taille moyenne au cinquième jour est observée dans les deux méthodes confirmant la robustesse de la méthode RMN diffusionnelle.

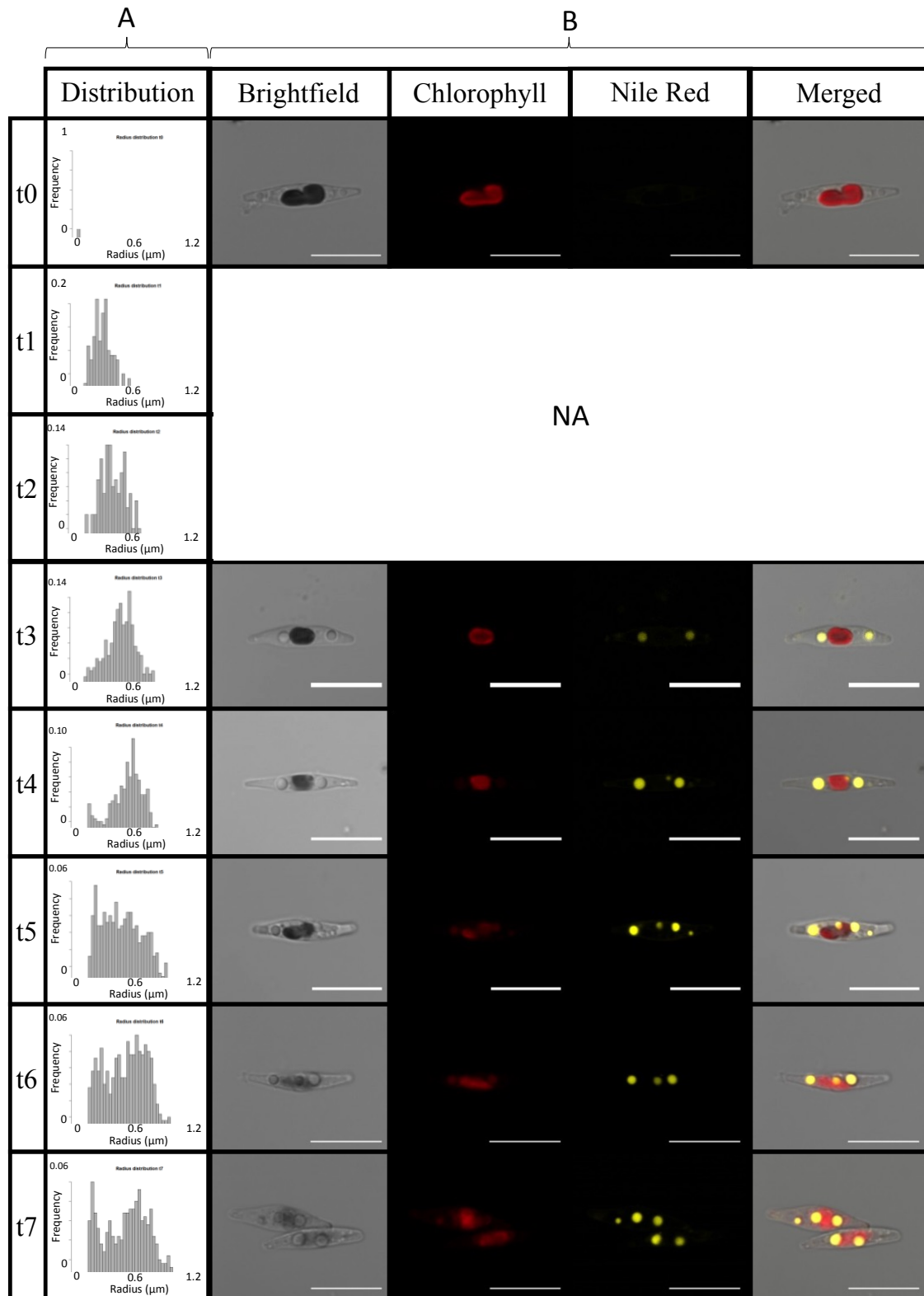


Figure 78 : Suivi de la dynamique des gouttelettes lipidiques de *Phaeodactylum tricornerutum* par imagerie confocale et évaluation de taille des rayons des gouttelettes lipidiques. A : Distribution des rayons des gouttelettes lipidiques. B : Imageries confocales de *Phaeodactylum tricornerutum* au cours d'une carence en azote de sept jours. Les gouttelettes d'huile ont été visualisées après coloration par le rouge de Nil (en jaune). Le chloroplaste est détecté par autofluorescence de la chlorophylle (en rouge). La

barre d'échelle correspond à 10 μm . NA indique que les acquisitions au confocale ne sont pas disponibles.

La mesure par microscopie à épifluorescence est une méthode lourde, impliquant la détermination de la taille de gouttelettes lipidiques de plusieurs centaines de cellules afin d'avoir une représentation statistiquement fiable de la taille de la gouttelette lipidique. La mesure par RMN diffusionnelle présente l'avantage d'être une méthode *in vivo* rapide, non-invasive et se basant notamment sur la mesure de la taille des gouttelettes lipidiques de l'intégralité de l'échantillon contre une centaine de cellules pour la microscopie à épifluorescence. Cependant, la microscopie est une méthode nous permettant l'observation de plusieurs populations de gouttelettes lipidiques, chose impossible avec la RMN qui donne une valeur moyenne de la taille de l'ensemble des populations de gouttelettes lipidiques (**Figure 78A**). Ces deux approches sont donc complémentaires.

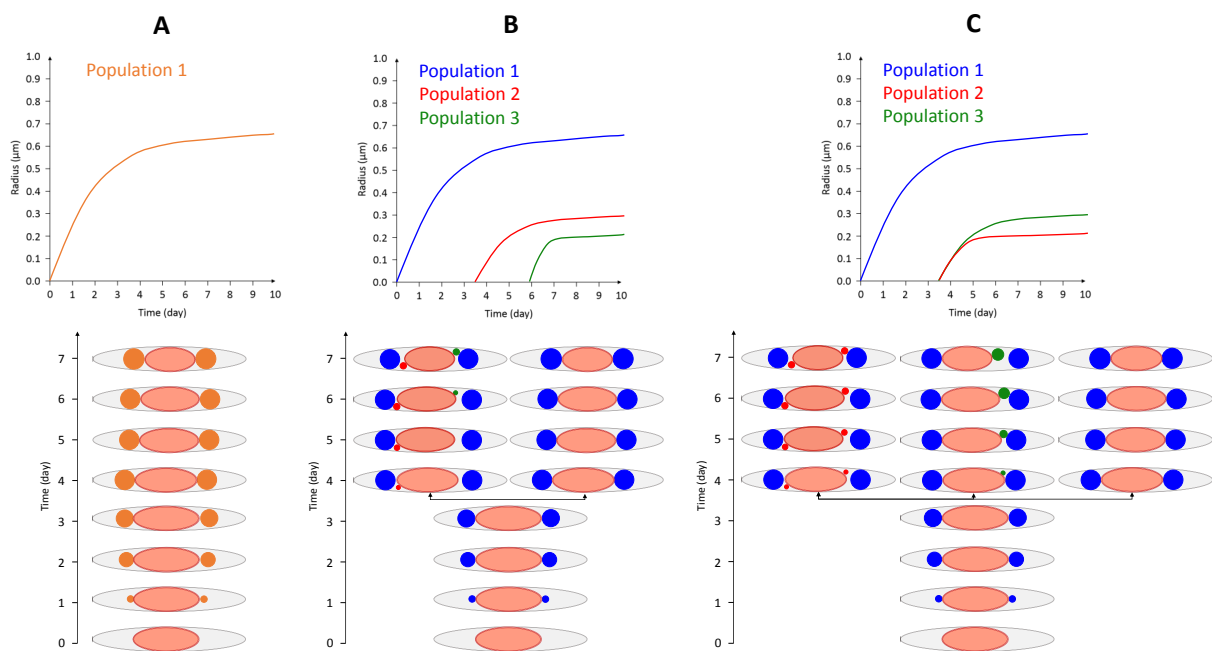


Figure 79 : Représentations schématiques des hypothèses de biogenèse de gouttelettes lipidiques à l'intérieur de cellules de *Phaeodactylum*. A : Modèle se basant sur la production d'une seule population de gouttelettes lipidiques. B : Production de trois populations de gouttelettes à trois temps différents. C : Trois populations sont produites à deux temps différents.

On observe, au cours de la carence en azote, l'apparition de trois populations successives de gouttelettes lipidiques aux jours 0, 4 et 5. De ces observations, trois hypothèses ont pu être émises sur la dynamique de biogenèse de la gouttelette lipidique (**Figure 79**) :

- Hypothèse 1 : Une seule population (P_1) de gouttelettes lipidiques évolue au cours de la carence en azote. A partir des données expérimentales, cette hypothèse est peu probable car on observe l'apparition de deux populations au jour 4 puis de trois populations à partir du jour 5 (**Figure 79A**).
- Hypothèse 2 : Trois populations (P_1 , P_2 et P_3) de gouttelettes lipidiques apparaissent à trois temps différents : P_1 apparaît au jour 0, P_2 au jour 4 puis P_3 au jour 5 (**Figure 79B**).
- Hypothèse 3 : Trois populations de gouttelettes lipidiques apparaissent à deux jours différents : P_1 apparaît au jour 0 et P_2 et P_3 apparaissent au jour 4 (**Figure 79C**). P_2 et P_3 diffèrent dans la taille maximale du rayon.

Les hypothèses 2 et 3 suggèrent des modèles où le rayon moyen de la gouttelette reste le même alors que la quantité de TAG continue de croître (**Figures 76D et 77**). En effet, la population 1 grossit mais l'arrivée des populations 2 et 3 fait diminuer la taille moyenne du rayon des gouttelettes lipidiques. L'apparition de plusieurs populations de gouttelettes lipidiques pourrait s'expliquer par un encombrement de l'espace cytosolique restant. A partir des données expérimentales, l'hypothèse 3 semble la plus vraisemblable (**Figure 79C**). En se basant sur cette troisième hypothèse, Antoine Jaussaud a cherché à développer un modèle déterministe représentant la biogenèse des gouttelettes lipidiques, en interprétant ces observations à l'aide de l'équation de Hill (Hill, 1910). Cette équation a été initialement formulée pour décrire la courbe de liaison de l' O_2 avec l'hémoglobine. Si on transpose cette équation de Hill dans le cadre de la détermination du rayon de la gouttelette lipidique (R_{LD}), on obtient la formule suivante :

$$R_{LD} = (R_{max} \times t^h) / (t_{1/2}^h + t^h)$$

Avec R_{LD} , le rayon de la gouttelette lipidique ; R_{max} , le rayon maximum de la gouttelette ; t , le temps de la carence ; h , la pente de la courbe et $t_{1/2}$, le temps nécessaire pour atteindre 50% de la taille du rayon de la gouttelette lipidique.

En adaptant les données expérimentales avec l'équation de Hill, il est possible de déduire des formules déterminant le rayon moyen ainsi que l'écart-type de chacune des populations des gouttelettes lipidiques en fonction du temps de carence (**Tableau 16**).

	Rayon moyen (μm)	Écart-type
Population 1	$\frac{0,67x^{1,2}}{1,18^{1,2} + x^{1,2}}$	$\frac{0,158x^{1,5}}{0,5^{1,5} + x^{1,5}}$
Population 2	$\frac{0,20x^{20}}{3,9^{20} + x^{20}}$	$\frac{0,05x^{23}}{7,15^{23} + x^{23}}$
Population 3	$\frac{0,36x^{14}}{4,2^{14} + x^{14}} - \frac{0,05x^{14}}{x^{14} + 7^{14}}$	$0,05 - \frac{0,05x^{23}}{7,15 + x^{23}}$

Tableau 16 : Modèle déterministe pour la dynamique de biogenèse des trois populations de gouttelettes lipidiques de l'hypothèse trois. Le facteur x représente ici le temps de carence en azote.

3. Conclusion & perspectives

Ces travaux illustrent, d'une part, le potentiel de la RMN diffusionnelle pour déterminer la taille des gouttelettes lipidiques *in vivo*. D'autre part, ces données complémentaires apportent une nouvelle vision du mécanisme de biogenèse de la gouttelette lipidique chez *Phaeodactylum*. Le modèle mathématique déterministe de croissance des populations de gouttelettes lipidiques chez *Phaeodactylum* se base notamment sur l'ajustement d'un seul paramètre : la taille disponible dans la cellule. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un modèle prédictif de la biogenèse de la gouttelette lipidique est développé chez *Phaeodactylum*. Cette approche peut constituer un nouveau moyen d'appréhender les mécanismes de biogenèse chez de nombreux modèles d'études.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Abe, T., Kobayashi, T., and Saito, T. (2005). Properties of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase with High Specific Activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *Journal of Bacteriology* *187*, 6982-6990.
- Abell, B.M., Holbrook, L.A., Abenes, M., Murphy, D.J., Hills, M.J., and Moloney, M.M. (1997). Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting. *The Plant Cell* *9*, 1481-1493.
- Abida, H., Dolch, L.-J., Meï, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M.A., Finazzi, G., Bastien, O., Tirichine, L., Bowler, C., et al. (2015). Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiology* *167*, 118.
- Acevedo, F., Rubilar, M., Shene, C., Navarrete, P., Romero, F., Rabert, C., Jolivet, P., Valot, B., and Chardot, T. (2012). Seed Oil Bodies from *Gevuina avellana* and *Madia sativa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *60*, 6994-7004.
- Agarwal, A.K., Arioglu, E., de Almeida, S., Akkoc, N., Taylor, S.I., Bowcock, A.M., Barnes, R.I., and Garg, A. (2002). AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nature Genetics* *31*, 21.
- Aizaki, H., Lee, K.-J., Sung, V.M.H., Ishiko, H., and Lai, M.M.C. (2004). Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* *324*, 450-461.
- Alboresi, A., Perin, G., Vitulo, N., Diretto, G., Block, M., Jouhet, J., Meneghesso, A., Valle, G., Giuliano, G., Maréchal, E., et al. (2016). Light Remodels Lipid Biosynthesis in *Nannochloropsis gaditana* by Modulating Carbon Partitioning between Organelles. *Plant Physiology* *171*, 2468-2482.
- Alipanah, L., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A.M., and Brembu, T. (2015). Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Experimental Botany* *66*, 6281-6296.
- Allorent, G., Courtois, F., Chevalier, F., and Lerbs-Mache, S. (2013). Plastid gene expression during chloroplast differentiation and dedifferentiation into non-photosynthetic plastids during seed formation. *Plant Molecular Biology* *82*, 59-70.
- Altmann, R. (1890). *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zuden Zellen*, (Veit, Leipzig).
- Alvarez, H., and Steinbüchel, A. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* *60*, 367-376.
- Alvarez, H.M. (2016). Triacylglycerol and wax ester-accumulating machinery in prokaryotes. *Biochimie* *120*, 28-39.
- Anderson, A.J., and Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* *54*, 450-472.
- Andrews, J., and Mudd, J.B. (1985). Phosphatidylglycerol Synthesis in Pea Chloroplasts: Pathway and Localization. *Plant Physiology* *79*, 259-265.
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., and Chabre, M. (1997). N-Terminal Hydrophobic Residues of the G-Protein ADP-Ribosylation Factor-1 Insert into Membrane Phospholipids upon GDP to GTP Exchange. *Biochemistry* *36*, 4675-4684.
- Archibald, J.M., and Keeling, P.J. (2002). Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics* *18*, 577-584.
- Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E., Apt, K.E., Bechner, M., et al. (2004). The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* *306*, 79.
- Armbrust, E.V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* *459*, 185.
- Armstrong, H.A., and Brasier, M.D. (2013). Diatoms. In *Microfossils*.
- Arrese, E.L., Rivera, L., Masakazu, H., Mirza, S., Hartson, S.D., Weintraub, S., and Soulages, J.L. (2008). Function and structure of Lipid Storage Droplet Protein 1 studied in lipoprotein complexes. *Archives of biochemistry and biophysics* *473*, 42-47.
- Ashrafi, G., and Schwarz, T.L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death and Differentiation* *20*, 31-42.
- Asp, L., Kartberg, F., Fernandez-Rodriguez, J., Smedh, M., Elsnér, M., Laporte, F., Bárcena, M., Jansen, K.A., Valentijn, J.A., Koster, A.J., et al. (2009). Early Stages of Golgi Vesicle and Tubule Formation Require Diacylglycerol. *Molecular Biology of the Cell* *20*, 780-790.
- Asrar, J., and Gruys, K. (2002). *Biodegradable polymer (Biopol®)*, Wiley, Weinheim Edition.
- Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S.D., and Daum, G. (1999). Identification and Characterization of Major Lipid Particle Proteins of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* *181*, 6441-6448.

Références Bibliographiques

- Athenstaedt, K., Jolivet, P., Boulard, C., Zivy, M., Negroni, L., Nicaud, J.-M., and Chardot, T. (2006). Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *PROTEOMICS* 6, 1450-1459.
- Attar, N., and Cullen, P.J. (2010). The retromer complex. *Advances in Enzyme Regulation* 50, 216-236.
- ### B
- Barka, F., Angstenberger, M., Ahrendt, T., Lorenzen, W., Bode, H.B., and Büchel, C. (2016). Identification of a triacylglycerol lipase in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 239-248.
- Barth, G., and Gaillardin, C. (1996). *Yarrowia lipolytica*. In *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*, K. Wolf, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 313-388.
- Bartz, R., Li, W.-H., Venables, B., Zehmer, J.K., Roth, M.R., Welti, R., Anderson, R.G.W., Liu, P., and Chapman, K.D. (2007). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *Journal of Lipid Research* 48, 837-847.
- Bastien, O., Botella, C., Chevalier, F., Block, M.A., Jouhet, J., Breton, C., Girard-Egrot, A., and Maréchal, E. (2016). Chapter One - New Insights on Thylakoid Biogenesis in Plant Cells. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Volume 323, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 1-30.
- Baud, S., Dichow, N.R., Kelemen, Z., d'Andréa, S., To, A., Berger, N., Canonge, M., Kronenberger, J., Viterbo, D., Dubreucq, B., et al. (2009). Regulation of HSD1 in Seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 50, 1463-1478.
- Beck, R., Ravet, M., Wieland, F.T., and Cassel, D. (2009). The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Letters* 583, 2701-2709.
- Beck, R., Sun, Z., Adolf, F., Rutz, C., Bassler, J., Wild, K., Sinning, I., Hurt, E., Brügger, B., Béthune, J., et al. (2008). Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 11731-11736.
- Beilstein, F., Bouchoux, J., Rousset, M., and Demignot, S. (2013). Proteomic Analysis of Lipid Droplets from Caco-2/TC7 Enterocytes Identifies Novel Modulators of Lipid Secretion. *PLOS ONE* 8, e53017.
- Belland, R., Ojcius, D.M., and Byrne, G.I. (2004). Focus: *Chlamydia*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 530.
- Beller, M., Bulankina, A.V., Hsiao, H.-H., Urlaub, H., Jäckle, H., and Kühnlein, R.P. (2010). PERILIPIN-Dependent Control of Lipid Droplet Structure and Fat Storage in *Drosophila*. *Cell Metabolism* 12, 521-532.
- Beller, M., Riedel, D., Jansch, L., Dieterich, G., Wehland, J., Jäckle, H., and Kühnlein, R.P. (2006). Characterization of the *Drosophila* Lipid Droplet Subproteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 5, 1082-1094.
- Beller, M., Sztalryd, C., Southall, N., Bell, M., Jäckle, H., Auld, D.S., and Oliver, B. (2008). COPI Complex Is a Regulator of Lipid Homeostasis. *PLoS Biology* 6, e292.
- Benning, C., Huang, Z.H., and Gage, D.A. (1995). Accumulation of a Novel Glycolipid and a Betaine Lipid in Cells of *Rhodobacter sphaeroides* Grown under Phosphate Limitation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 317, 103-111.
- Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biology* 4, 2311-2324.
- Bersuker, K., and Olzmann, J.A. (2017). Establishing the lipid droplet proteome: Mechanisms of lipid droplet protein targeting and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, 1166-1177.
- Bi, J., Xiang, Y., Chen, H., Liu, Z., Grönke, S., Kühnlein, R.P., and Huang, X. (2012). Opposite and redundant roles of the two *Drosophila* perilipins in lipid mobilization. *Journal of Cell Science* 125, 3568.
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K., and Carroll, D. (2003). Enhancing Gene Targeting with Designed Zinc Finger Nucleases. *Science* 300, 764.
- Bickel, P.E., Tansey, J.T., and Welte, M.A. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 419-440.
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D., and Cohen, Z. (2002). Biosynthesis of arachidonic acid in the oleaginous microalga *Parietochloris incisa* (Chlorophyceae): Radiolabeling studies. *Lipids* 37, 209-216.
- Bindsbøll, C., Berg, O., Arntsen, B., Nebb, H.I., and Dalen, K.T. (2013). Fatty acids regulate perilipin5 in muscle by activating PPAR α . *Journal of Lipid Research* 54, 1949-1963.
- Blée, E. (1998). Biosynthesis of phytooxylipins: the Peroxygenase pathway. *Lipid / Fett* 100, 121-127.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.

Références Bibliographiques

- Blouin, C.M., Le Lay, S., Eberl, A., Köfeler, H.C., Guerrero, I.C., Klein, C., Le Liepvre, X., Lasnier, F., Bourron, O., Gautier, J.-F., et al. (2010). Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *Journal of Lipid Research* 51, 945-956.
- Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2011). TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. *Science* 333, 1843.
- Bohlin, K. (1897). Zur Morphologie und Biologie einzelliger Algen.
- Botella, C., Sautron, E., Boudiere, L., Michaud, M., Dubots, E., Yamaryo-Botté, Y., Albrieux, C., Marechal, E., Block, M.A., and Jouhet, J. (2016). ALA10, a Phospholipid Flippase, Controls FAD2/FAD3 Desaturation of Phosphatidylcholine in the ER and Affects Chloroplast Lipid Composition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 170, 1300-1314.
- Botté, C.Y., and Maréchal, E. (2014). Plastids with or without galactoglycerolipids. *Trends in Plant Science* 19, 71-78.
- Botté, C.Y., Yamaryo-Botté, Y., Janouškovec, J., Rupasinghe, T., Keeling, P.J., Crellin, P., Coppel, R.L., Maréchal, E., McConville, M.J., and McFadden, G.I. (2011). Identification of Plant-like Galactolipids in *Chromera velia*, a Photosynthetic Relative of Malaria Parasites. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 29893-29903.
- Bouchoux, J., Beilstein, F., Pauquai, T., Guerrero, I.C., Chateau, D., Ly, N., Alqub, M., Klein, C., Chambaz, J., Rousset, M., et al. (2011). The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated Caco-2/TC7 enterocytes reveals cell-specific characteristics. *Biology of the Cell* 103, 499-517.
- Boudière, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J., et al. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 470-480.
- Bourgis, F., Kilaru, A., Cao, X., Ngando-Ebongue, G.-F., Drira, N., Ohlogge, J.B., and Arondel, V. (2011). Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 1252.
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otiillar, R.P., et al. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L., and Wang, R. (2004). Proteomic Analysis of Proteins Associated with Lipid Droplets of Basal and Lipolytically Stimulated 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279, 46835-46842.
- Brasaemle, D.L., and Wolins, N.E. (2016). Isolation of Lipid Droplets from Cells by Density Gradient Centrifugation. *Current protocols in cell biology* 72, 3.15.11-13.15.13.
- Bréhélin, C., Kessler, F., and van Wijk, K.J. (2007). Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science* 12, 260-266.
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., and Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports* 6, 26612.
- Brocard, L., Immel, F., Coulon, D., Esnay, N., Tuphile, K., Pascal, S., Claverol, S., Fouillen, L., Bessoule, J.-J., and Bréhélin, C. (2017). Proteomic Analysis of Lipid Droplets from Arabidopsis Aging Leaves Brings New Insight into Their Biogenesis and Functions. *Frontiers in Plant Science* 8, 894.
- Burch, A.R., and Franz, A.K. (2016). Combined nitrogen limitation and hydrogen peroxide treatment enhances neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresource Technology* 219, 559-565.
- Buseman, C.M., Tamura, P., Sparks, A.A., Baughman, E.J., Maatta, S., Zhao, J., Roth, M.R., Esch, S.W., Shah, J., Williams, T.D., et al. (2006). Wounding Stimulates the Accumulation of Glycerolipids Containing Oxophytodienoic Acid and Dinor-Oxophytodienoic Acid in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiology* 142, 28.
- Bussell, R., and Eliezer, D. (2003). A Structural and Functional Role for 11-mer Repeats in α -Synuclein and Other Exchangeable Lipid Binding Proteins. *Journal of Molecular Biology* 329, 763-778.
- ## C
- Cagliari, A., Margis, R., dos Santos Maraschin, F., Carina Turchetto-Zolet, A., Loss, G., and Margis-Pinheiro, M. (2011). Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and algae. *International Journal of Plant Biology* 2, 40-52.
- Cai, Y., Goodman, J.M., Pyc, M., Mullen, R.T., Dyer, J.M., and Chapman, K.D. (2015). Arabidopsis SEIPIN Proteins Modulate Triacylglycerol Accumulation and Influence Lipid Droplet Proliferation. *The Plant Cell* 27, 2616-2636.
- Caire-Brändli, I., Papadopoulos, A., Malaga, W., Marais, D., Canaan, S., Thilo, L., and de Chastellier, C. (2014). Reversible Lipid Accumulation and Associated Division Arrest of *Mycobacterium avium* in Lipoprotein-Induced Foamy Macrophages May Resemble Key Events during Latency and Reactivation of Tuberculosis. *Infection and Immunity* 82, 476-490.

Références Bibliographiques

- Camus, G., Herker, E., Modi, A.A., Haas, J.T., Ramage, H.R., Farese, R.V., and Ott, M. (2013). Diacylglycerol Acyltransferase-1 Localizes Hepatitis C Virus NS5A Protein to Lipid Droplets and Enhances NS5A Interaction with the Viral Capsid Core. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 9915-9923.
- Cañavate, J.P., Armada, I., Ríos, J.L., and Hachero-Cruzado, I. (2016). Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* 124, 68-78.
- Caño-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-García, S., Cheng, J.-C., Nam, K.H., Li, J., and Chory, J. (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* 131, 5341.
- Carroll, D. (2011). Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. *Genetics* 188, 773-782.
- Carvalho, F.A., Carneiro, F.A., Martins, I.C., Assunção-Miranda, I., Faustino, A.F., Pereira, R.M., Bozza, P.T., Castanho, M.A.R.B., Mohana-Borges, R., Da Poian, A.T., et al. (2012). Dengue Virus Capsid Protein Binding to Hepatic Lipid Droplets (LD) Is Potassium Ion Dependent and Is Mediated by LD Surface Proteins. *Journal of Virology* 86, 2096-2108.
- Castorena, K.M., Stapleford, K.A., and Miller, D.J. (2010). Complementary transcriptomic, lipidomic, and targeted functional genetic analyses in cultured *Drosophila* cells highlight the role of glycerophospholipid metabolism in Flock House virus RNA replication. *BMC Genomics* 11, 183-183.
- Cavalier-Smith, T. (1986). The kingdom *Chromista*: origin and systematics, Volume 4, (Biopress, Bristol).
- Cavalier-Smith, T. (2018). Kingdom *Chromista* and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. *Protoplasma* 255, 297-357.
- Cermelli, S., Guo, Y., Gross, S.P., and Welte, M.A. (2006). The Lipid-Droplet Proteome Reveals that Droplets Are a Protein-Storage Depot. *Current Biology* 16, 1783-1795.
- Chanarin, I., Patel, A., Slavin, G., Wills, E.J., Andrews, T.M., and Stewart, G. (1975). Neutral-lipid storage disease: a new disorder of lipid metabolism. *British Medical Journal* 1, 553-555.
- Chandler, D. (2005). Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* 437, 640.
- Chapman, K.D., Dyer, J.M., and Mullen, R.T. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *Journal of Lipid Research* 53, 215-226.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Béraud-Dufour, S., Jackson, C.L., and Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384, 481.
- Chawla, A., Lee, C.-H., Barak, Y., He, W., Rosenfeld, J., Liao, D., Han, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2003). PPAR δ is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1268-1273.
- Chen, H.C., Smith, S.J., Ladha, Z., Jensen, D.R., Ferreira, L.D., Pulawa, L.K., McGuire, J.G., Pitas, R.E., Eckel, R.H., and Farese, R.V. (2002). Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1. *The Journal of Clinical Investigation* 109, 1049-1055.
- Chen, J.C., Tsai, C.C., and Tzen, J.T. (1999). Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Physiol* 40, 1079-1086.
- Chen, W., Chang, B., Wu, X., Li, L., Sleeman, M., and Chan, L. (2013). Inactivation of Plin4 downregulates Plin5 and reduces cardiac lipid accumulation in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 304, E770-E779.
- Chen, X., and Goodman, J.M. (2017). The collaborative work of droplet assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, 1205-1211.
- Chen, Y., Ding, Y., Yang, L., Yu, J., Liu, G., Wang, X., Zhang, S., Yu, D., Song, L., Zhang, H., et al. (2014). Integrated omics study delineates the dynamics of lipid droplets in *Rhodococcus opacus* PD630. *Nucleic Acids Research* 42, 1052-1064.
- Chen, Z., Du, S., and Fang, S. (2012). gp78: a Multifaceted Ubiquitin Ligase that Integrates a Unique Protein Degradation Pathway from the Endoplasmic Reticulum. *Current Protein & Peptide Science* 13, 414-424.
- Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C.F., Courousse, N., Chwetzoff, S., Trugnan, G., Keshavan, N., Lever, A., and Desselberger, U. (2010). Rotaviruses Associate with Cellular Lipid Droplet Components To Replicate in Viroplasms, and Compounds Disrupting or Blocking Lipid Droplets Inhibit Viroplasm Formation and Viral Replication. *Journal of Virology* 84, 6782-6798.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294-306.
- Chisti, Y. (2013). Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology* 167, 201-214.

Références Bibliographiques

- Cho, S.Y., Shin, E.S., Park, P.J., Shin, D.W., Chang, H.K., Kim, D., Lee, H.H., Lee, J.H., Kim, S.H., Song, M.J., et al. (2007). Identification of Mouse Prp19p as a Lipid Droplet-associated Protein and Its Possible Involvement in the Biogenesis of Lipid Droplets. *Journal of Biological Chemistry* 282, 2456-2465.
- Choe, S., Fujioka, S., Noguchi, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., and Feldmann, K.A. (2001). Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in Arabidopsis. *The Plant Journal* 26, 573-582.
- Choi, K., Kim, H., Kang, H., Lee, S.-Y., Lee, S.J., Back, S.H., Lee, S.H., Kim, M.S., Lee, J.E., Park, J.Y., et al. (2014). Regulation of diacylglycerol acyltransferase 2 protein stability by gp78-associated endoplasmic-reticulum-associated degradation. *The FEBS Journal* 281, 3048-3060.
- Chorlay, A., and Thiam, A.R. (2018). An Asymmetry in Monolayer Tension Regulates Lipid Droplet Budding Direction. *Biophysical Journal* 114, 631-640.
- Choudhary, V., Golden, A., and Prinz, W.A. (2016). Keeping FIT, storing fat: Lipid droplet biogenesis. *Worm* 5, e1170276.
- Choudhary, V., Ojha, N., Golden, A., and Prinz, W.A. (2015). A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *The Journal of Cell Biology* 211, 261-271.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 186, 757-761.
- Chu, L., Ewe, D., Río Bártulos, C., Kroth, P.G., and Gruber, A. (2016). Rapid induction of GFP expression by the nitrate reductase promoter in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PeerJ* 4, e2344.
- Chua, N.-H. (1980). Electrophoretic analysis of chloroplast proteins. In *Methods in Enzymology*, Volume 69, A. San Pietro, ed. (Academic Press), pp. 434-446.
- Chughtai, A.A., Kaššák, F., Kostrouchová, M., Novotný, J.P., Krause, M.W., Saudek, V., Kostrouch, Z., and Kostrouchová, M. (2015). Perilipin-related protein regulates lipid metabolism in *C. elegans*. *PeerJ* 3, e1213.
- Clouse, S.D., and Sasse, J.M. (1998). BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 427-451.
- Cocchiari, J.L., Kumar, Y., Fischer, E.R., Hackstadt, T., and Valdivia, R.H. (2008). Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9379-9384.
- Coffey, C.M., Sheh, A., Kim, I.S., Chandran, K., Nibert, M.L., and Parker, J.S.L. (2006). Reovirus Outer Capsid Protein $\mu 1$ Induces Apoptosis and Associates with Lipid Droplets, Endoplasmic Reticulum, and Mitochondria. *Journal of Virology* 80, 8422-8438.
- Collins, J.R., Edwards, B.R., Fredricks, H.F., and Van Mooy, B.A.S. (2016). LOBSTAHS: An Adduct-Based Lipidomics Strategy for Discovery and Identification of Oxidative Stress Biomarkers. *Analytical Chemistry* 88, 7154-7162.
- Conte, M., Lupette, J., Seddiki, K., Meï, C., Dolch, L.-J., Gros, V., Barette, C., Rébeillé, F., Jouhet, J., and Maréchal, E. (2018). Screening for Biologically Annotated Drugs That Trigger Triacylglycerol Accumulation in the Diatom *Phaeodactylum*. *Plant Physiology* 177, 532.
- Cooksey, K.E., Guckert, J.B., Williams, S.A., and Callis, P.R. (1987). Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of Microbiological Methods* 6, 333-345.
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* 26, 1367.
- Crawford, S.A., Higgins, M.J., Mulvaney, P., and Wetherbee, R. (2001). Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy. *Journal of Phycology* 37, 543-554.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., and Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology* 16, 23-52.
- Crunk, A.E., Monks, J., Murakami, A., Jackman, M., MacLean, P.S., Ladinsky, M., Bales, E.S., Cain, S., Orlicky, D.J., and McManaman, J.L. (2013). Dynamic Regulation of Hepatic Lipid Droplet Properties by Diet. *PLoS ONE* 8, e67631.
- Cui, S., Hayashi, Y., Otomo, M., Mano, S., Oikawa, K., Hayashi, M., and Nishimura, M. (2016). Sucrose production mediated by lipid metabolism suppresses physical interaction of peroxisomes and oil bodies during germination of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*.
- Cui, Y., Zhao, J., Wang, Y., Qin, S., and Lu, Y. (2018). Characterization and engineering of a dual-function diacylglycerol acyltransferase in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnology for Biofuels* 11, 32.
- Curtis, B.A., Tanifuji, G., Burki, F., Gruber, A., Irimia, M., Maruyama, S., Arias, M.C., Ball, S.G., Gile, G.H., Hirakawa, Y., et al. (2012). Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* 492, 59.

Références Bibliographiques

Czabany, T., Wagner, A., Zweytick, D., Lohner, K., Leitner, E., Ingolic, E., and Daum, G. (2008). Structural and Biochemical Properties of Lipid Particles from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 17065-17074.

D

D'Avila, H., Freire-de-Lima, C.G., Roque, N.R., Teixeira, L., Barja-Fidalgo, C., Silva, A.R., Melo, R.C.N., DosReis, G.A., Castro-Faria-Neto, H.C., and Bozza, P.T. (2011). Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E2 Generation and Increased Parasite Growth. *The Journal of Infectious Diseases* 204, 951-961.

da Costa, E., Silva, J., Mendonça, S.H., Abreu, M.H., and Domingues, M.R. (2016). Lipidomic Approaches towards Deciphering Glycolipids from Microalgae as a Reservoir of Bioactive Lipids. *Marine Drugs* 14, 101.

Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A., Dubois, G., Guyot, V., Perez-Michaut, C., Amato, A., Falciatore, A., Juillerat, A., Beurdeley, M., et al. (2014). Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nature Communications* 5, 3831.

Dahlhoff, M., Fröhlich, T., Arnold, G.J., Müller, U., Leonhardt, H., Zouboulis, C.C., and Schneider, M.R. (2015). Characterization of the sebocyte lipid droplet proteome reveals novel potential regulators of sebaceous lipogenesis. *Experimental Cell Research* 332, 146-155.

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

Dalen, K.T., Ulven, S.M., Arntsen, B.M., Solaas, K., and Nebb, H.I. (2006). PPAR α activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver. *Journal of Lipid Research* 47, 931-943.

Dalen, K.T., Dahl, T., Holter, E., Arntsen, B., Londos, C., Sztalryd, C., and Nebb, H.I. (2007). LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771, 210-227.

Daly, R., and Hearn, M.T.W. (2004). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* 18, 119-138.

D'Andrea, S. (2016). Lipid droplet mobilization: The different ways to loosen the purse strings. *Biochimie* 120, 17-27.

Davidi, L., Katz, A., and Pick, U. (2012). Characterization of major lipid droplet proteins from *Dunaliella*. *Planta* 236, 19-33.

Davidi, L., Levin, Y., Ben-Dor, S., and Pick, U. (2015). Proteome Analysis of Cytoplasmic and Plastidic β -Carotene Lipid Droplets in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 167, 60-79.

De Cara, S., Goussebaïle, A., Grateau, R., Levert, F., Quemener, J., and Vermont, B. (2012). Revue critique des études évaluant l'effet des changements d'affectation des sols sur les bilans environnementaux des biocarburants. (Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par l'INRA (contrat 10-60-C0039)).

De Riso, V., Raniello, R., Maumus, F., Rogato, A., Bowler, C., and Falciatore, A. (2009). Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Research* 37, e96-e96.

Degerman, E., Landström, T.R., Wijkander, J., Holst, L.S., Ahmad, F., Belfrage, P., and Manganiello, V. (1998). Phosphorylation and Activation of Hormone-Sensitive Adipocyte Phosphodiesterase Type 3B. *Methods* 14, 43-53.

Degraeve-Guilbault, C., Bréhélin, C., Haslam, R., Sayanova, O., Marie-Luce, G., Jouhet, J., and Corellou, F. (2017). Glycerolipid Characterization and Nutrient Deprivation-Associated Changes in the Green Picoalga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiology* 173, 2060.

Dellero, Y., Cagnac, O., Rose, S., Seddiki, K., Cussac, M., Morabito, C., Lupette, J., Aiese Cigliano, R., Sanseverino, W., Kuntz, M., et al. (2018a). Proposal of a new thraustochytrid genus *Hondaea* gen. nov. and comparison of its lipid dynamics with the closely related pseudo-cryptic genus *Aurantiochytrium*. *Algal Research* 35, 125-141.

Dellero, Y., Rose, S., Metton, C., Morabito, C., Lupette, J., Jouhet, J., Maréchal, E., Rébeillé, F., and Amato, A. (2018b). Ecophysiology and lipid dynamics of a eukaryotic mangrove decomposer. *Environmental Microbiology* 20(8), 3057-3068.

Demé, B., Cataye, C., Block, M.A., Maréchal, E., and Jouhet, J. (2014). Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *The FASEB Journal* 28, 3373-3383.

den Brok, M.H., Raaijmakers, T.K., Collado-Camps, E., and Adema, G.J. (2018). Lipid Droplets as Immune Modulators in Myeloid Cells. *Trends in Immunology* 39, 380-392.

Dennis, D., McCoy, M., Stangl, A., Valentin, H.E., and Wu, Z. (1998). Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology* 64, 177-186.

Références Bibliographiques

- Deruyffelaere, C., Bouchez, I., Morin, H., Guillot, A., Miquel, M., Froissard, M., Chardot, T., and D'Andrea, S. (2015). Ubiquitin-Mediated Proteasomal Degradation of Oleosins is Involved in Oil Body Mobilization During Post-Germinative Seedling Growth in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 56, 1374-1387.
- Deruyffelaere, C., Purkrtova, Z., Bouchez, I., Collet, B., Cacas, J.-L., Chardot, T., Gallois, J.L., and Andrea, S. (2018). PUX10 associates with CDC48A and regulates the dislocation of ubiquitinated oleosins from seed lipid droplets. *The Plant Cell*.
- Di Dato, V., Orefice, I., Amato, A., Fontanarosa, C., Amoresano, A., Cutignano, A., Ianora, A., and Romano, G. (2017). Animal-like prostaglandins in marine microalgae. *The ISME Journal* 11, 1722.
- Didderen, I., Destain, J., and Thonart, P. (2009). Le bioéthanol de seconde génération - La production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique.
- Dinamarca, J., Levitan, O., Kumaraswamy, G.K., Lun, D.S., and Falkowski, P.G. (2017). Overexpression of a diacylglycerol acyltransferase gene in *Phaeodactylum tricornutum* directs carbon towards lipid biosynthesis. *Journal of Phycology* 53, 405-414.
- Ding, Y., Wu, Y., Zeng, R., and Liao, K. (2012). Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 44, 394-406.
- Ding, Y., Yang, L., Zhang, S., Wang, Y., Du, Y., Pu, J., Peng, G., Chen, Y., Zhang, H., Yu, J., et al. (2012). Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets. *Journal of Lipid Research* 53, 399-411.
- Dolch, L.-J., Lupette, J., Tourcier, G., Bedhomme, M., Collin, S., Magneschi, L., Conte, M., Seddiki, K., Richard, C., Corre, E., et al. (2017). Nitric Oxide Mediates Nitrite-Sensing and Acclimation and Triggers a Remodeling of Lipids. *Plant Physiology* 175, 1407.
- Dolch, L.-J., and Maréchal, E. (2015). Inventory of Fatty Acid Desaturases in the Pennate Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Drugs* 13, 1317-1339.
- Dolch, L.-J., Rak, C., Perin, G., Tourcier, G., Broughton, R., Leterrier, M., Morosinotto, T., Tellier, F., Faure, J.-D., Falconet, D., et al. (2017). A Palmitic Acid Elongase Affects Eicosapentaenoic Acid and Plastidial Monogalactosyldiacylglycerol Levels in *Nannochloropsis*. *Plant Physiology* 173, 742-759.
- Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P.G., Boland, W., Zähringer, U., and Heinz, E. (2003). New Insight into *Phaeodactylum tricornutum* Fatty Acid Metabolism. Cloning and Functional Characterization of Plastidial and Microsomal Δ 12-Fatty Acid Desaturases. *Plant Physiology* 131, 1648-1660.
- Donaldson, J.G., Cassel, D., Kahn, R.A., and Klausner, R.D. (1992). ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6408-6412.
- Dong, H., and Czaja, M.J. (2011). Regulation of lipid droplets by autophagy. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22, 234-240.
- Dorfman, M.L., Hershko, C., Eisenberg, S., and Sagher, F. (1974). Ichthyosiform dermatosis with systemic lipidosis. *Archives of Dermatology* 110, 261-266.
- Dorrell, R.G., and Smith, A.G. (2011). Do Red and Green Make Brown?: Perspectives on Plastid Acquisitions within Chromalveolates. *Eukaryotic Cell* 10, 856-868.
- Douce, R. (1974). Site of Biosynthesis of Galactolipids in Spinach Chloroplasts. *Science* 183, 852.
- Du, X., Barisch, C., Paschke, P., Herrfurth, C., Bertinetti, O., Pawolleck, N., Otto, H., Rühling, H., Feussner, I., Herberg, F.W., et al. (2013). *Dictyostelium* Lipid Droplets Host Novel Proteins. *Eukaryotic Cell* 12, 1517-1529.
- Du, Z.-Y., and Benning, C. (2016). Triacylglycerol Accumulation in Photosynthetic Cells in Plants and Algae. In *Lipids in Plant and Algae Development*, Y. Nakamura and Y. Li-Beisson, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 179-205.
- Dubots, E., Botté, C., Boudière, L., Yamaryo-Botté, Y., Jouhet, J., Maréchal, E., and Block, M.A. (2012). Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie* 94, 86-93.
- Dunahay, T.G., Jarvis, E.E., and Roessler, P.G. (1995). Genetic Transformation Of The Diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *Journal of Phycology* 31, 1004-1012.

E

- Eastmond, P.J. (2006). SUGAR-DEPENDENT1 Encodes a Patatin Domain Triacylglycerol Lipase That Initiates Storage Oil Breakdown in Germinating *Arabidopsis* Seeds. *The Plant Cell* 18, 665-675.
- Echevarría, W., Leite, M.F., Guerra, M.T., Zipfel, W.R., and Nathanson, M.H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature cell biology* 5, 440-446.

Références Bibliographiques

- Edvardsson, U., Ljungberg, A., Lindén, D., William-Olsson, L., Peilot-Sjögren, H., Ahnmark, A., and Oscarsson, J. (2006). PPAR α activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. *Journal of Lipid Research* 47, 329-340.
- Eggers, J., and Steinbüchel, A. (2013). Poly(3-Hydroxybutyrate) Degradation in *Ralstonia eutropha* H16 Is Mediated Stereoselectively to (S)-3-Hydroxybutyryl Coenzyme A (CoA) via Crotonyl-CoA. *Journal of Bacteriology* 195, 3213-3223.
- Emre, S., Ünver, N., Evans, S.E., Yüzbaşıoğlu, A., Gürakan, F., Gümrük, F., and Karaduman, A. (2010). Molecular analysis of Chanarin-Dorfman syndrome (CDS) patients: Identification of novel mutations in the ABHD5 gene. *European Journal of Medical Genetics* 53, 141-144.

F

- Fabris, M., Matthijs, M., Carbonelle, S., Moses, T., Pollier, J., Dasseville, R., Baart, G.J.E., Vyverman, W., and Goossens, A. (2014). Tracking the sterol biosynthesis pathway of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytologist* 204, 521-535.
- Falkowski, P.G., Barber, R.T., and Smetacek, V. (1998). Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281, 200-206.
- Fan, J., Andre, C., and Xu, C. (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* 585, 1985-1991.
- Fan, J., Yan, C., and Xu, C. (2013a). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase-mediated triacylglycerol biosynthesis is crucial for protection against fatty acid-induced cell death in growing tissues of Arabidopsis. *The Plant Journal* 76, 930-942.
- Fan, J., Yan, C., Zhang, X., and Xu, C. (2013b). Dual Role for Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase: Enhancing Fatty Acid Synthesis and Diverting Fatty Acids from Membrane Lipids to Triacylglycerol in Arabidopsis Leaves. *The Plant Cell* 25, 3506-3518.
- Faucher, P., and Poitou, C. (2016). Physiopathologie de l'obésité. *Revue du Rhumatisme Monographies* 83, 6-12.
- Fedina, E., Yarin, A., Mukhitova, F., Blufard, A., and Chechetkin, I. (2017). Brassinosteroid-induced changes of lipid composition in leaves of *Pisum sativum* L. during senescence. *Steroids* 117, 25-28.
- Fei, W., Shui, G., Gaeta, B., Du, X., Kuerschner, L., Li, P., Brown, A.J., Wenk, M.R., Parton, R.G., and Yang, H. (2008). Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *The Journal of Cell Biology* 180, 473-482.
- Fei, W., Shui, G., Zhang, Y., Krahmer, N., Ferguson, C., Kapterian, T.S., Lin, R.C., Dawes, I.W., Brown, A.J., Li, P., et al. (2011). A Role for Phosphatidic Acid in the Formation of "Supersized" Lipid Droplets. *PLoS Genetics* 7, e1002201.
- Fernández-Ulibarri, I., Vilella, M., Lázaro-Diéguez, F., Sarri, E., Martínez, S.E., Jiménez, N., Claro, E., Mérida, I., Burger, K.N.J., and Egea, G. (2007). Diacylglycerol Is Required for the Formation of COPI Vesicles in the Golgi-to-ER Transport Pathway. *Molecular Biology of the Cell* 18, 3250-3263.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., and Falkowski, P. (1998). Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281, 237-240.
- Flori, S., Jouneau, P.-H., Finazzi, G., Maréchal, E., and Falconet, D. (2016). Ultrastructure of the Periplastidial Compartment of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist* 167, 254-267.
- Folch, J., Lees, M., and Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Fonagy, A., Ohnishi, A., Esumi, Y., Suzuki, Y., and Matsumoto, S. (2006). Further Studies of Lipid Droplets in the Bombykol-Producing Pheromone Gland of *Bombyx mori*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040, 310-314.
- Footitt, S., Slocombe, S.P., Lerner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A., and Holdsworth, M. (2002). Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *The EMBO Journal* 21, 2912-2922.
- Foret, L. (2014). Shape and energy of a membrane bud induced by protein coats or viral protein assembly. *The European Physical Journal E* 37, 42.
- Fowler, D., Pyle, J.A., Raven, J.A., and Sutton, M.A. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century: introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368, 20130165.
- Francis, S.H., Busch, J.L., and Corbin, J.D. (2010). cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacological Reviews* 62, 525-563.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., and Paris, S. (1996). Myristoylation-facilitated Binding of the G Protein ARF1 to Membrane Phospholipids Is Required for Its Activation by a Soluble Nucleotide Exchange Factor. *Journal of Biological Chemistry* 271, 1573-1578.

Références Bibliographiques

- Frandsen, G., Müller-Uri, F., Nielsen, M., Mundy, J., and Skriver, K. (1996). Novel Plant Ca-binding Protein Expressed in Response to Abscisic Acid and Osmotic Stress. *Journal of Biological Chemistry* 271, 343-348.
- Frederic, P., and Philippe, D. (2007). Meganucleases and DNA Double-Strand Break-Induced Recombination: Perspectives for Gene Therapy. *Current Gene Therapy* 7, 49-66.
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Sakai, J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S., and Takano, T. (2004). Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1644, 47-59.
- Füssy, Z., and Oborník, M. (2018). Complex Endosymbioses I: From Primary to Complex Plastids, Multiple Independent Events. In *Plastids: Methods and Protocols*, E. Maréchal, ed. (New York, NY: Springer US), pp. 17-35.

G

- Gallina, A.A., Chung, C.-C., and Casotti, R. (2015). Expression of death-related genes and reactive oxygen species production in *Skeletonema tropicum* upon exposure to the polyunsaturated aldehyde octadienal. *Advances in Oceanography and Limnology*; Vol 6, No 1/2 (2015)DO - 10.4081/aiol.2015.5466.
- Garg, A., and Agarwal, A.K. (2009). Lipodystrophies: Disorders of adipose tissue biology. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 507-513.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E2579-E2586.
- Gaunt, E.R., Zhang, Q., Cheung, W., Wakelam, M.J.O., Lever, A.M.L., and Desselberger, U. (2013). Lipidome analysis of rotavirus-infected cells confirms the close interaction of lipid droplets with viroplasm. *The Journal of General Virology* 94, 1576-1586.
- Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T.M., and Thomas-Oates, J.E. (2002). The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Molecular Microbiology* 32, 63-73.
- Georgieva, D., Schmitt, V., Leal-Calderon, F., and Langevin, D. (2009). On the Possible Role of Surface Elasticity in Emulsion Stability. *Langmuir* 25, 5565-5573.
- Gerecht, A., Romano, G., Ianora, A., d'Ippolito, G., Cutignano, A., and Fontana, A. (2011). Plasticity of oxylipin metabolism among clones of the marine diatom *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 47, 1050-1056.
- Gerngross, T.U., Reilly, P., Stubbe, J., Sinskey, A.J., and Peoples, O.P. (1993). Immunocytochemical analysis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. *Journal of Bacteriology* 175, 5289-5293.
- Geske, T., vom Dorp, K., Dörmann, P., and Hölzl, G. (2013). Accumulation of glycolipids and other non-phosphorous lipids in *Agrobacterium tumefaciens* grown under phosphate deprivation. *Glycobiology* 23, 69-80.
- Ghosh, A.K., Ramakrishnan, G., Chandramohan, C., and Rajasekharan, R. (2008). CGI-58, the Causative Gene for Chanarin-Dorfman Syndrome, Mediates Acylation of Lysophosphatidic Acid. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 24525-24533.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison Iii, C.A., and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 6, 343.
- Gidda, S.K., Watt, S.C., Collins-Silva, J., Kilaru, A., Arondel, V., Yurchenko, O., Horn, P.J., James, C.N., Shintani, D., Ohlrogge, J.B., et al. (2013). Lipid droplet-associated proteins (LDAPs) are involved in the compartmentalization of lipophilic compounds in plant cells. *Plant Signaling & Behavior* 8, e27141.
- Gidda, S.K., Park, S., Pyc, M., Yurchenko, O., Cai, Y., Wu, P., Andrews, D.W., Chapman, K.D., Dyer, J.M., and Mullen, R.T. (2016). Lipid Droplet-Associated Proteins (LDAPs) Are Required for the Dynamic Regulation of Neutral Lipid Compartmentation in Plant Cells. *Plant Physiology* 170, 2052-2071.
- Gocze, P.M., and Freeman, D.A. (1994). Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 leydig tumor cells. *Cytometry* 17, 151-158.
- Goh, V.J., Tan, J.S.Y., Tan, B.C., Seow, C., Ong, W.-Y., Lim, Y.C., Sun, L., Ghosh, S., and Silver, D.L. (2015). Postnatal Deletion of Fat Storage-inducing Transmembrane Protein 2 (FIT2/FITM2) Causes Lethal Enteropathy. *The Journal of Biological Chemistry* 290, 25686-25699.
- Gong, J., Sun, Z., Wu, L., Xu, W., Schieber, N., Xu, D., Shui, G., Yang, H., Parton, R.G., and Li, P. (2011). Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *The Journal of Cell Biology* 195, 953-963.
- Gong, Y., Guo, X., Wan, X., Liang, Z., and Jiang, M. (2011). Characterization of a novel thioesterase (PtTE) from *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Basic Microbiology* 51, 666-672.

Références Bibliographiques

- Gong, Y., Zhang, J., Guo, X., Wan, X., Liang, Z., Hu, C.J., and Jiang, M. (2013). Identification and characterization of PtDGAT2B, an acyltransferase of the DGAT2 acyl-Coenzyme A: Diacylglycerol acyltransferase family in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *FEBS Letters* 587, 481-487.
- Goodson, C., Roth, R., Wang, Z.T., and Goodenough, U. (2011). Structural Correlates of Cytoplasmic and Chloroplast Lipid Body Synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and Stimulation of Lipid Body Production with Acetate Boost. *Eukaryotic Cell* 10, 1592-1606.
- Goold, H.D., Beisson, F., Peltier, G., and Li-Beisson, Y. (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Reports* 34, 545-555.
- Goold, H.D., Nguyen, H.M., Kong, F., Beyly-Adriano, A., Légeret, B., Billon, E., Cuié, S., Beisson, F., Peltier, G., and Li-Beisson, Y. (2016). Whole Genome Re-Sequencing Identifies a Quantitative Trait Locus Repressing Carbon Reserve Accumulation during Optimal Growth in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports* 6, 25209.
- Goto-Yamada, S., Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Yamawaki, R., Kato, A., and Nishimura, M. (2014). Chaperone and protease functions of LON protease 2 modulate the peroxisomal transition and degradation with autophagy. *Plant and Cell Physiology* 55, 482-496.
- Gounaris, K., and Barber, J. (1983). Monogalactosyldiacylglycerol: The most abundant polar lipid in nature. *Trends in Biochemical Sciences* 8, 378-381.
- Grahn, T.H.M., Zhang, Y., Lee, M.-J., Sommer, A.G., Mostoslavsky, G., Fried, S.K., Greenberg, A.S., and Puri, V. (2013). FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 432, 296-301.
- Granneman, J.G., Moore, H.-P.H., Krishnamoorthy, R., and Rathod, M. (2009). Perilipin Controls Lipolysis by Regulating the Interactions of AB-hydrolase Containing 5 (Abhd5) and Adipose Triglyceride Lipase (Atgl). *The Journal of Biological Chemistry* 284, 34538-34544.
- Granneman, J.G., Kimler, V.A., Zhang, H., Ye, X., Luo, X., Postlethwait, J.H., and Thummel, R. (2017). Lipid droplet biology and evolution illuminated by the characterization of a novel perilipin in teleost fish. *eLife* 6, e21771.
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., and Londos, C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *Journal of Biological Chemistry* 266, 11341-11346.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., and Fowler, S.D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology* 100, 965-973.
- Grillitsch, K., Connerth, M., Köfeler, H., Arrey, T.N., Rietschel, B., Wagner, B., Karas, M., and Daum, G. (2011). Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: Lipidome meets Proteome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811, 1165-1176.
- Grippa, A., Buxó, L., Mora, G., Funaya, C., Idrissi, F.-Z., Mancuso, F., Gomez, R., Muntanyà, J., Sabidó, E., and Carvalho, P. (2015). The seipin complex Fld1/Ldb16 stabilizes ER-lipid droplet contact sites. *The Journal of Cell Biology* 211, 829-844.
- Gromova, M., Guillermo, A., Bayle, P.-A., and Bardet, M. (2015). In vivo measurement of the size of oil bodies in plant seeds using a simple and robust pulsed field gradient NMR method. *European Biophysics Journal* 44, 121-129.
- Grönke, S., Müller, G., Hirsch, J., Fellert, S., Andreou, A., Haase, T., Jäckle, H., and Kühnlein, R.P. (2007). Dual Lipolytic Control of Body Fat Storage and Mobilization in *Drosophila*. *PLoS Biology* 5, e137.
- Gros, V., Lupette, J., and Jouhet, J. (2018). Extraction and Quantification of Lipids from Plant or Algae. In *Plastids: Methods and Protocols*, E. Maréchal, ed. (New York, NY: Springer US), pp. 213-240.
- Gross, D.A., Zhan, C., and Silver, D.L. (2011). Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 19581-19586.
- Guihéneuf, F., Leu, S., Zarka, A., Khozin-Goldberg, I., Khalilov, I., and Boussiba, S. (2011). Cloning and molecular characterization of a novel acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1-like gene (PtDGAT1) from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *The FEBS Journal* 278, 3651-3666.
- Guo, B., Lei, C., Ito, T., Yaxiaer, Y., Kobayashi, H., Jiang, Y., Tanaka, Y., Ozeki, Y., and Goda, K. (2017). High-throughput label-free screening of *euglena gracilis* with optofluidic time-stretch quantitative phase microscopy. In *SPIE BiOS*, Volume 10076. (SPIE), p. 12.
- Guo, Y., Walther, T.C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J.S., Vale, R.D., Walter, P., and Farese, R.V. (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453, 657-661.
- Gupta, P., and Kaur, G. (2005). Chanarin Dorfman syndrome neonatal diagnosis and 3-year follow-up. *Indian Pediatrics* 42, 1054-1055.

Références Bibliographiques

Guy, A., Oger, C., Heppekausen, J., Signorini, C., De Felice, C., Fürstner, A., Durand, T., and Galano, J.-M. (2014). Oxygenated Metabolites of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids as Potential Oxidative Stress Biomarkers: Total Synthesis of 8-F_{3t}-IsoP, 10-F_{4t}-NeuroP and [D4]-10-F_{4t}-NeuroP. *Chemistry - A European Journal* 20, 6374-6380.

H

Haeckel, E. (1904). *Kunstformen der Natur*.

Hagel, J.M., Yeung, E.C., and Facchini, P.J. (2008). Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in Plant Science* 13, 631-639.

Hamberg, M., Ponce de Leon, I., Rodriguez, M.J., and Castresana, C. (2005). α -Dioxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 169-174.

Hamilton, M.L., Powers, S., Napier, J.A., and Sayanova, O. (2016). Heterotrophic Production of Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids by Trophically Converted Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Drugs* 14, 53.

Hammond, G.R.V., Fischer, M.J., Anderson, K.E., Holdich, J., Koteci, A., Balla, T., and Irvine, R.F. (2012). PI4P And PI(4,5)P(2) Are Essential But Independent Lipid Determinants Of Membrane Identity. *Science (New York, N.Y.)* 337, 727-730.

Han, J., Lu, Q., Zhou, L., Zhou, J., and Xiang, H. (2007). Molecular Characterization of the phaEC(Hm) Genes, Required for Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) in the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula marismortui*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6058-6065.

Hanano, A., Burcklen, M., Flenet, M., Ivancich, A., Louwagie, M., Garin, J., and Blée, E. (2006). Plant Seed Peroxygenase Is an Original Heme-oxygenase with an EF-hand Calcium Binding Motif. *Journal of Biological Chemistry* 281, 33140-33151.

Hänisch, J., Wältermann, M., Robenek, H., and Steinbüchel, A. (2006). The *Ralstonia eutropha* H16 phasin PhaP1 is targeted to intracellular triacylglycerol inclusions in *Rhodococcus opacus* PD630 and *Mycobacterium smegmatis* mc2155, and provides an anchor to target other proteins. *Microbiology* 152, 3271-3280.

Hanstein, J. (1880). Ueber die Gestaltungsvorgänge in den Zellkerne beider Theilung der Zellen. *Botan Abhandl Morphol Physiol Bonn* 4.

Harayama, S., Kasai, Y., and Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 205-214.

Harchouni, S., Field, B., and Menand, B. (2018). AC-202, a highly effective fluorophore for the visualization of lipid droplets in green algae and diatoms. *Biotechnology for Biofuels* 11, 120.

Hasle, G.R., Syvertsen, E.E., Steidinger, K.A., Tangen, K., and Tomas, C.R. (1996). *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. (Elsevier Science).

Hayashi, Y.K., Matsuda, C., Ogawa, M., Goto, K., Tominaga, K., Mitsuhashi, S., Park, Y.-E., Nonaka, I., Hino-Fukuyo, N., Haginoya, K., et al. (2009). Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 2623-2633.

Haywood, G.W., Anderson, A.J., and Dawes, E.A. (1989). The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters* 57, 1-6.

He, L., Han, X., and Yu, Z. (2014). A Rare *Phaeodactylum tricornutum* Cruciform Morphotype: Culture Conditions, Transformation and Unique Fatty Acid Characteristics. *PLoS ONE* 9, e93922.

Heaton, N.S., and Randall, G. (2010). Dengue virus induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell host & microbe* 8, 422-432.

Henne, W.M., Reese, M.L., and Goodman, J.M. (2018). The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. *The EMBO Journal* 37.

Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehele, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., and Ott, M. (2010). Efficient Hepatitis C Virus Particle Formation Requires Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1). *Nature medicine* 16, 1295-1298.

Hershko, A., Ciechanover, A., and Varshavsky, A. (2000). The ubiquitin system. *Nature Medicine* 6, 1073.

Hewitt, F.R., Hough, T., O'Neill, P., Sasse, J.M., Williams, E.G., and Rowan, K.S. (1985). Effect of Brassinolide and other Growth Regulators on the Germination and Growth of Pollen Tubes of *Prunus avium* using a Multiple Hanging-drop Assay. *Functional Plant Biology* 12, 201-211.

Hibert, M. (2011). Collections of molecules for screening: example of the french national chemical library. In *Chemogenomics and Chemical Genetics: A User's Introduction for Biologists, Chemists and Informaticians*, E. Marechal, S. Roy and L. Lafanechère, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 23-28.

Références Bibliographiques

- Hickenbottom, S.J., Kimmel, A.R., Londos, C., and Hurley, J.H. (2004). Structure of a Lipid Droplet Protein: The PAT Family Member TIP47. *Structure* 12, 1199-1207.
- Hill, A. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Lond)* 10, 4-7.
- Hopes, A., Nekrasov, V., Kamoun, S., and Mock, T. (2016). Editing of the urease gene by CRISPR-Cas in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Methods* 12, 49.
- Horn, P.J., James, C.N., Gidda, S.K., Kilaru, A., Dyer, J.M., Mullen, R.T., Ohlrogge, J.B., and Chapman, K.D. (2013). Identification of a New Class of Lipid Droplet-Associated Proteins in Plants. *Plant Physiology* 162, 1926-1936.
- Horner, R.A. (2002). A taxonomic guide to some common marine phytoplankton, (Biopress).
- Howe, G.A. (2018). Metabolic end run to jasmonate. *Nature Chemical Biology* 14, 109.
- Hsieh, K., and Huang, A.H.C. (2004). Endoplasmic Reticulum, Oleosins, and Oils in Seeds and Tapetum Cells. *Plant Physiology* 136, 3427-3434.
- Hu, X., Binns, D., and Reese, M.L. (2017). The coccidian parasites *Toxoplasma* and *Neospora* dysregulate mammalian lipid droplet biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 292, 11009-11020.
- Huang, A.H.C. (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiology* 110, 1055-1061.
- Huang, A.H.C. (2018). Plant Lipid Droplets and Their Associated Proteins: Potential for Rapid Advances. *Plant Physiology* 176, 1894-1918.
- Huang, M.-D., and Huang, A.H.C. (2015). Bioinformatics Reveal Five Lineages of Oleosins and the Mechanism of Lineage Evolution Related to Structure/Function from Green Algae to Seed Plants. *Plant Physiology* 169, 453-470.
- Hubert, F., Poisson, L., Loiseau, C., Gauvry, L., Pencreac'h, G., Hérault, J., and Ergon, F. (2017). Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*. *OCL* 24, D407.
- Hurkman, W.J., and Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiology* 81, 802-806.
- Ikari, N., Shimizu, A., and Asano, T. (2018). Lysosomal Acid Lipase Deficiency in Japan: A Case Report of Siblings and a Literature Review of Cases in Japan. *Journal of Nippon Medical School* 85, 131-137.
- I**
- Imai, Y., Varela, G.M., Jackson, M.B., Graham, M.J., Crooke, R.M., and Ahima, R.S. (2007). Reduction of Hepatosteatosis and Lipid Levels by an Adipose Differentiation-Related Protein Antisense Oligonucleotide. *Gastroenterology* 132, 1947-1954.
- Imamura, M., Inoguchi, T., Ikuyama, S., Taniguchi, S., Kobayashi, K., Nakashima, N., and Nawata, H. (2002). ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 283, E775-E783.
- Inhoffen, H., and Hohlweg, W. (1938). Neue per os-wirksame weibliche Keimdrüsenhormon-Derivate: 17-Aethinyl-oestradiol und Pregnen-in-on-3-ol-17. *Naturwissenschaften* 26, 96.
- Irshad, Z., Dimitri, F., Christian, M., and Zammit, V.A. (2017). Diacylglycerol acyltransferase 2 links glucose utilization to fatty acid oxidation in the brown adipocytes. *Journal of Lipid Research* 58, 15-30.
- Ivanov, S.É., and Belyakov, A.V. (2008). Diatomite and its applications. *Glass and Ceramics* 65, 48-51.
- Ivashov, V.A., Grillitsch, K., Koefeler, H., Leitner, E., Baeumlisberger, D., Karas, M., and Daum, G. (2013). Lipidome and proteome of lipid droplets from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1831, 282-290.
- J**
- Jaccard, T., Ariztegui, D., and Wilkinson, K.J. (2009). Incorporation of zinc into the frustule of the freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii*. *Chemical Geology* 265, 381-386.
- Jackson, L.P. (2014). Structure and mechanism of COPI vesicle biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 29, 67-73.
- Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9, 574-587.
- Jambunathan, S., Yin, J., Khan, W., Tamori, Y., and Puri, V. (2011). FSP27 Promotes Lipid Droplet Clustering and Then Fusion to Regulate Triglyceride Accumulation. *PLoS ONE* 6, e28614.

Références Bibliographiques

- James, C.N., Horn, P.J., Case, C.R., Gidda, S.K., Zhang, D., Mullen, R.T., Dyer, J.M., Anderson, R.G.W., and Chapman, K.D. (2010). Disruption of the *Arabidopsis* CGI-58 homologue produces Cholesterol-like lipid droplet accumulation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 17833-17838.
- James, G.O., Hocart, C.H., Hillier, W., Chen, H., Kordbacheh, F., Price, G.D., and Djordjevic, M.A. (2011). Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation. *Bioresource Technology* *102*, 3343-3351.
- Javee, A., Sulochana, S.B., Palliserry, S.J., and Arumugam, M. (2016). Major Lipid Body Protein: A Conserved Structural Component of Lipid Body Accumulated during Abiotic Stress in *S. quadricauda* CASA-CC202. *Frontiers in Energy Research* *4*.
- Jeffryes, C., Gutu, T., Jiao, J., and Rorrer, G.L. (2008). Metabolic Insertion of Nanostructured TiO₂ into the Patterned Biosilica of the Diatom *Pinnularia* sp. by a Two-Stage Bioreactor Cultivation Process. *ACS Nano* *2*, 2103-2112.
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology* *191*, 3195-3202.
- Jendrossek, D., and Pfeiffer, D. (2013). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology* *16*, 2357-2373.
- Jensen, E.V., and DeSombre, E.R. (1973). Estrogen-Receptor Interaction. *Science* *182*, 126.
- Ji, X.-J., Zhang, A.-H., Nie, Z.-K., Wu, W.-J., Ren, L.-J., and Huang, H. (2014). Efficient arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* through a repeated fed-batch fermentation strategy. *Bioresource Technology* *170*, 356-360.
- Jiang, P.-L., Pasaribu, B., and Chen, C.-S. (2014). Nitrogen-Deprivation Elevates Lipid Levels in *Symbiodinium* spp. by Lipid Droplet Accumulation: Morphological and Compositional Analyses. *PLOS ONE* *9*, e87416.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* *337*, 816.
- Jolivet, P., Roux, E., d'Andrea, S., Davanture, M., Negroni, L., Zivy, M., and Chardot, T. (2004). Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* *42*, 501-509.
- Jolivet, P., Boulard, C., Bellamy, A., Larré, C., Barre, M., Rogniaux, H., d'Andréa, S., Chardot, T., and Nesi, N. (2009). Protein composition of oil bodies from mature *Brassica napus* seeds. *PROTEOMICS* *9*, 3268-3284.
- Jolivet, P., Acevedo, F., Boulard, C., d'Andréa, S., Faure, J.-D., Kohli, A., Nesi, N., Valot, B., and Chardot, T. (2013). Crop seed oil bodies: From challenges in protein identification to an emerging picture of the oil body proteome. *PROTEOMICS* *13*, 1836-1849.
- Jordans, G.H.W. (1953). The Familial Occurrence of Fat Containing Vacuoles in the Leukocytes Diagnosed in two Brothers Suffering from Dystrophia Musculorum Progressiva (ERB). *Acta Medica Scandinavica* *145*, 419-423.
- Jouhet, J., Maréchal, E., and Block, M.A. (2007). Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Progress in Lipid Research* *46*, 37-55.
- Jouhet, J. (2013). Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in Plant Science* *4*, 494.
- Jouhet, J., Lupette, J., Clerc, O., Magneschi, L., Bedhomme, M., Collin, S., Roy, S., Maréchal, E., and Rébeillé, F. (2017). LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: Consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. *PLOS ONE* *12*, e0182423.

K

- Kabalnov, A., Weers, J., Arlauskas, R., and Tarara, T. (1995a). Phospholipids as Emulsion Stabilizers. 1. Interfacial Tensions. *Langmuir* *11*, 2966-2974.
- Kabalnov, A., Tarara, T., Arlauskas, R., and Weers, J. (1996b). Phospholipids as Emulsion Stabilizers: 2. Phase Behavior versus Emulsion Stability. *Journal of Colloid and Interface Science* *184*, 227-235.
- Kadereit, B., Kumar, P., Wang, W.-J., Miranda, D., Snapp, E.L., Severina, N., Torregroza, I., Evans, T., and Silver, D.L. (2008). Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 94-99.
- Kalscheuer, R., Stöveken, T., Malkus, U., Reichelt, R., Golyshin, P.N., Sabirova, J.S., Ferrer, M., Timmis, K.N., and Steinbüchel, A. (2007). Analysis of Storage Lipid Accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: Evidence for Alternative Triacylglycerol Biosynthesis Routes in Bacteria. *Journal of Bacteriology* *189*, 918-928.
- Kalscheuer, R., Wältermann, M., Alvarez, H., and Steinbüchel, A. (2001). Preparative isolation of lipid inclusions from *Rhodococcus opacus* and *Rhodococcus ruber* and identification of granule-associated proteins. *Archives of Microbiology* *177*, 20-28.

Références Bibliographiques

- Kanshin, E., Wang, S., Ashmarina, L., Fedjaev, M., Nifant'ev, I., Mitchell, G.A., and Pshezhetsky, A.V. (2009). The stoichiometry of protein phosphorylation in adipocyte lipid droplets: Analysis by N-terminal isotope tagging and enzymatic dephosphorylation. *PROTEOMICS* 9, 5067-5077.
- Karas, B.J., Diner, R.E., Lefebvre, S.C., McQuaid, J., Phillips, A.P.R., Noddings, C.M., Brunson, J.K., Valas, R.E., Deerinck, T.J., Jablanovic, J., et al. (2015). Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. *Nature Communications* 6, 6925.
- Katavic, V., Agrawal, G.K., Hajduch, M., Harris, S.L., and Thelen, J.J. (2006). Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars. *PROTEOMICS* 6, 4586-4598.
- Kato, M., Sakai, M., Adachi, K., Ikemoto, H., and Sano, H. (1996). Distribution of betaine lipids in marine algae. *Phytochemistry* 42, 1341-1345.
- Kaur, S., and Spillane, C. (2015). Reduction in Carotenoid Levels in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricorutum* by Artificial MicroRNAs Targeted Against the Endogenous Phytoene Synthase Gene. *Marine Biotechnology* 17, 1-7.
- Ke, J., Behal, R.H., Back, S.L., Nikolau, B.J., Wurtele, E.S., and Oliver, D.J. (2000). The Role of Pyruvate Dehydrogenase and Acetyl-Coenzyme A Synthetase in Fatty Acid Synthesis in Developing Arabidopsis Seeds. *Plant Physiology* 123, 497-508.
- Kellogg, R.B., and Patton, J.S. (1983). Lipid droplets, medium of energy exchange in the symbiotic anemone *Condylactis gigantea*: a model coral polyp. *Marine Biology* 75, 137-149.
- Kelly, A.A., Quettier, A.-L., Shaw, E., and Eastmond, P.J. (2011). Seed Storage Oil Mobilization Is Important But Not Essential for Germination or Seedling Establishment in Arabidopsis. *Plant Physiology* 157, 866-875.
- Kelly, A.A., and Feussner, I. (2016). Oil is on the agenda: Lipid turnover in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 1253-1268.
- Khandelia, H., Duelund, L., Pakkanen, K.I., and Ipsen, J.H. (2010). Triglyceride Blisters in Lipid Bilayers: Implications for Lipid Droplet Biogenesis and the Mobile Lipid Signal in Cancer Cell Membranes. *PLOS ONE* 5, e12811.
- Khozin-Goldberg, I., and Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water euglenophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67, 696-701.
- Kim, C.A., Delépine, M., Boutet, E., El Mourabit, H., Le Lay, S., Meier, M., Nemani, M., Bridel, E., Leite, C.C., Bertola, D.R., et al. (2008). Association of a Homozygous Nonsense Caveolin-1 Mutation with Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93, 1129-1134.
- Kim, E.Y., Park, K.Y., Seo, Y.S., and Kim, W.T. (2016). Arabidopsis Small Rubber Particle Protein Homolog SRPs Play Dual Roles as Positive Factors for Tissue Growth and Development and in Drought Stress Responses. *Plant Physiology* 170, 2494-2510.
- Kim, H.U., Hsieh, K., Ratnayake, C., and Huang, A.H.C. (2002). A Novel Group of Oleosins Is Present Inside the Pollen of Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 277, 22677-22684.
- Kim, J., Lee, H., Lee, H.N., Kim, S.H., Shin, K.D., and Chung, T. (2013). Autophagy-related proteins are required for degradation of peroxisomes in Arabidopsis hypocotyls during seedling growth. *Plant Cell* 25, 4956-4966.
- Kim, M.-J., Wainwright, H.C., Lockett, M., Bekker, L.-G., Walther, G.B., Dittrich, C., Visser, A., Wang, W., Hsu, F.-F., Wiehart, U., et al. (2010). Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Molecular Medicine* 2, 258-274.
- Kim, Y., Terng, E.L., Riekhof, W.R., Cahoon, E.B., and Cerutti, H. (2018). Endoplasmic reticulum acyltransferase with prokaryotic substrate preference contributes to triacylglycerol assembly in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Kimmel, A.R., Brasaemle, D.L., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C., and Londos, C. (2010). Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *Journal of Lipid Research* 51, 468-471.
- Kimmel, A.R., and Sztalryd, C. (2014). Perilipin 5, a Lipid Droplet Protein Adapted to Mitochondrial Energy Utilization. *Current opinion in lipidology* 25, 110-117.
- Kimmel, A.R., and Sztalryd, C. (2016). The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis. *Annual Review of Nutrition* 36, 471-509.
- Klein-Marcuschamer, D., Chisti, Y., Benemann, J.R., and Lewis, D. (2013). A matter of detail: Assessing the true potential of microalgal biofuels. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 2317-2322.
- Koch, B., Schmidt, C., and Daum, G. (2014). Storage lipids of yeasts: a survey of nonpolar lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews* 38, 892-915.
- Kong, F., Romero, I.T., Warakanont, J., and Li-Beisson, Y. (2018). Lipid catabolism in microalgae. *New Phytologist* 218, 1340-1348.

Références Bibliographiques

- Kory, N., Farese, R.V., and Walther, T.C. (2016). Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends in cell biology* 26, 535-546.
- Kozłowski, L.P. (2016). IPC – Isoelectric Point Calculator. *Biology Direct* 11, 55.
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature Cell Biology* 10, 602-610.
- Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, H.W., Schmidt-Supprian, M., Vance, D.E., Mann, M., et al. (2011). Phosphatidylcholine Synthesis for Lipid Droplet Expansion Is Mediated by Localized Activation of CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase. *Cell metabolism* 14, 504-515.
- Kramer, D.A., Quiroga, A.D., Lian, J., Fahlman, R.P., and Lehner, R. (2018). Fasting and refeeding induces changes in the mouse hepatic lipid droplet proteome. *Journal of Proteomics* 181, 213-224.
- Kreimer, G. (2009). The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Current Genetics* 55, 19-43.
- Kretzschmar, F.K., Mengel, L.F., Müller, A., Schmitt, K., Biersch, K.F., Valerius, O., Braus, G., and Ischebeck, T. (2018). PUX10 is a lipid droplet-localized scaffold protein that interacts with CDC48 and is involved in the degradation of lipid droplet proteins. *The Plant Cell*.
- Kuerschner, L., Moessinger, C., and Thiele, C. (2007). Imaging of Lipid Biosynthesis: How a Neutral Lipid Enters Lipid Droplets. *Traffic* 9, 338-352.
- Kumar, Y., Cocchiaro, J., and Valdivia, R.H. (2006). The Obligate Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis* Targets Host Lipid Droplets. *Current Biology* 16, 1646-1651.
- Kuntam, S., Puskás, L.G., and Ayaydin, F. (2015). Characterization of a new class of blue-fluorescent lipid droplet markers for live-cell imaging in plants. *Plant Cell Reports* 34, 655-665.
- Kurusu, T., Koyano, T., Hanamata, S., Kubo, T., Noguchi, Y., Yagi, C., Nagata, N., Yamamoto, T., Ohnishi, T., Okazaki, Y., et al. (2014). OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy* 10, 878-888.
- Kusumaatmaja, H., and Lipowsky, R. (2011). Droplet-induced budding transitions of membranes. *Soft Matter* 7, 6914-6919.
- Kwiatkowska, M., Polit, J.T., Stępiński, D., Popłońska, K., Wojtczak, A., Dominguez, E., and Heredia, A. (2015). Lipotubuloids in ovary epidermis of *Ornithogalum umbellatum* act as metabolons: suggestion of the name 'lipotubuloid metabolon'. *Journal of Experimental Botany* 66, 1157-1163.
- Kwiatkowska, M., Stępiński, D., Popłońska, K., Wojtczak, A., and Polit, J. (2010). "Elaioplasts" of *Haemanthus albiflos* are true lipotubuloids: cytoplasmic domains rich in lipid bodies entwined by microtubules. *Acta Physiologiae Plantarum* 32, 1189-1196.
- ## L
- Laizet, Y., Pontier, D., Mache, R., and Kuntz, M. (2004). Subfamily Organization and Phylogenetic Origin of Genes Encoding Plastid Lipid-Associated Proteins of the Fibrillin Type. *Journal of Genome Science and Technology* 3, 19-28.
- Lands, W.E.M. (1958). Metabolism of Glycerolipides: A Comparison of Lecithin And Triglyceride Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 231, 883-888.
- Lands, W.E.M. (1960). Metabolism of Glycerolipids: II. The enzymatic Acylation of Lysolecithin. *Journal of Biological Chemistry* 235, 2233-2237.
- Lands, W.E.M., and Hart, P. (1965). Metabolism of Glycerolipids: VI. Specificities of acyl coenzyme-A:phospholipides acyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* 240, 1905-1911.
- Langhi, C., Marquart, T.J., Allen, R.M., and Baldán, Á. (2014). Perilipin-5 is regulated by statins and controls triglyceride contents in the hepatocyte. *Journal of hepatology* 61, 358-365.
- Larsson, S., Resjö, S., Gomez, M.F., James, P., and Holm, C. (2012). Characterization of the Lipid Droplet Proteome of a Clonal Insulin-producing β -Cell Line (INS-1 832/13). *Journal of Proteome Research* 11, 1264-1273.
- Leber, R., Zinser, E., Paltauf, F., Daum, G., and Zellnig, G. (1994). Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1421-1428.
- Lecoeur, H., Giraud, E., Prévost, M.-C., Milon, G., and Lang, T. (2013). Reprogramming Neutral Lipid Metabolism in Mouse Dendritic Leucocytes Hosting Live *Leishmania amazonensis* Amastigotes. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2276.
- Lee, M.C.S., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., and Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 87-123.

Références Bibliographiques

- Lee, R.G., Willingham, M.C., Davis, M.A., Skinner, K.A., and Rudel, L.L. (2000). Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. *Journal of Lipid Research* 41, 1991-2001.
- Lee, Y.K., Sohn, J.H., Han, J.S., Park, Y.J., Jeon, Y.G., Ji, Y., Dalen, K.T., Sztalryd, C., Kimmel, A.R., and Kim, J.B. (2018). *Perilipin 3* Deficiency Stimulates Thermogenic Beige Adipocytes Through PPAR α Activation. *Diabetes* 67, 791-804.
- Lefèvre, C., Jobard, F., Caux, F., Bouadjar, B., Karaduman, A., Heilig, R., Lakhdar, H., Wollenberg, A., Verret, J.-L., Weissenbach, J., et al. (2001). Mutations in CGI-58, the Gene Encoding a New Protein of the Esterase/Lipase/Thioesterase Subfamily, in Chanarin-Dorfman Syndrome. *American Journal of Human Genetics* 69, 1002-1012.
- Leo, A., Hansch, C., and Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews* 71, 525-616.
- Lersten, N.R., Czapinski, A.R., Curtis, J.D., Freckmann, R., and Horner, H.T. (2006). Oil bodies in leaf mesophyll cells of angiosperms: overview and a selected survey. *American Journal of Botany* 93, 1731-1739.
- Leterrier, M., Calleja, P., and Maréchal, E. (2015). Modified Algae strain and method of triacylglycerol accumulation using said strain. WO2015008160 A2.
- Levitan, O., Dinamarca, J., Zelzion, E., Lun, D.S., Guerra, L.T., Kim, M.K., Kim, J., Van Mooy, B.A.S., Bhattacharya, D., and Falkowski, P.G. (2015). Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 412-417.
- Lewis, M.J., and Pelham, H.R.B. (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162.
- Li, F., Asami, T., Wu, X., Tsang, E.W.T., and Cutler, A.J. (2007). A Putative Hydroxysteroid Dehydrogenase Involved in Regulating Plant Growth and Development. *Plant Physiology* 145, 87-97.
- Li, F., Chung, T., and Vierstra, R.D. (2014). AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 788-807.
- Li, X., Pan, Y., Hu, H. (2018). Identification of the triacylglycerol lipase in the chloroplast envelope of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research* 33, 440-447.
- Li, Z., Thiel, K., Thul, P.J., Beller, M., Kühnlein, R.P., and Welte, M.A. (2012). Lipid droplets control the maternal histone supply of *Drosophila* embryos. *Current biology* : CB 22, 2104-2113.
- Liang, M.-H., and Jiang, J.-G. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research* 52, 395-408.
- Li-Beisson, Y., Beisson, F., and Riekhof, W. (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 82, 504-522.
- Lin, I.P., Jiang, P.-L., Chen, C.-S., and Tzen, J.T.C. (2012). A unique caleosin serving as the major integral protein in oil bodies isolated from *Chlorella* sp. cells cultured with limited nitrogen. *Plant Physiology and Biochemistry* 61, 80-87.
- Lin, L.-J., Tai, S.S.K., Peng, C.-C., and Tzen, J.T.C. (2002). Steroleosin, a Sterol-Binding Dehydrogenase in Seed Oil Bodies. *Plant Physiology* 128, 1200-1211.
- Lin, L.-J., Liao, P.-C., Yang, H.-H., and Tzen, J.T.C. (2005). Determination and analyses of the N-termini of oil-body proteins, steroleosin, caleosin and oleosin. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 770-776.
- Lin, M., and Oliver, D.J. (2008). The Role of Acetyl-Coenzyme A Synthetase in Arabidopsis. *Plant Physiology* 147, 1822.
- Lin, P., Chen, X., Moktan, H., Arrese, E.L., Duan, L., Wang, L., Soulages, J.L., and Zhou, D.H. (2014). Membrane attachment and structure models of lipid storage droplet protein 1. *Biochimica et biophysica acta* 1838, 874-881.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1P11 of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46, 3-26.
- Lipinski, C.A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* 1, 337-341.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, R.D. (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67, 601-616.
- Liu, H., Wang, C., Chen, F., and Shen, S. (2015). Proteomic analysis of oil bodies in mature *Jatropha curcas* seeds with different lipid content. *Journal of Proteomics* 113, 403-414.
- Liu, K., and Czaja, M.J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death and Differentiation* 20, 3-11.

Références Bibliographiques

- Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D.I., Zhu, M., and Anderson, R.G.W. (2004). Chinese Hamster Ovary K2 Cell Lipid Droplets Appear to Be Metabolic Organelles Involved in Membrane Traffic. *Journal of Biological Chemistry* 279, 3787-3792.
- Liu, Y., Kahn, R.A., and Prestegard, J.H. (2009). Structure and Membrane Interaction of Myristoylated ARF1. *Structure (London, England : 1993)* 17, 79-87.
- Longworth, J., Wu, D., Huete-Ortega, M., Wright, P.C., and Vaidyanathan, S. (2016). Proteome response of *Phaeodactylum tricorutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion. *Algal Research* 18, 213-224.
- López-Ribera, I., La Paz, J.L., Repiso, C., García, N., Miquel, M., Hernández, M.L., Martínez-Rivas, J.M., and Vicent, C.M. (2014). The Evolutionary Conserved Oil Body Associated Protein OBAP1 Participates in the Regulation of Oil Body Size. *Plant Physiology* 164, 1237-1249.
- Low, K.L., Shui, G., Natter, K., Yeo, W.K., Kohlwein, S.D., Dick, T., Rao, S.P.S., and Wenk, M.R. (2010). Lipid Droplet-associated Proteins Are Involved in the Biosynthesis and Hydrolysis of Triacylglycerol in *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 21662-21670.
- Lu, Y., Wang, X., Balamurugan, S., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Dong, H.-P., and Li, H.-Y. (2017). Identification of a putative seipin ortholog involved in lipid accumulation in marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Applied Phycology* 29, 2821-2829.
- Lundin, C., Nordström, R., Wagner, K., Windpassinger, C., Andersson, H., von Heijne, G., and Nilsson, I. (2006). Membrane topology of the human seipin protein. *FEBS Letters* 580, 2281-2284.
- Luo, M., Fadeev, E.A., and Groves, J.T. (2005). Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages. *Nature Chemical Biology* 1, 149.
- Lupette, J., Lami, R., Krasovec, M., Grimsley, N., Moreau, H., Piganeau, G., and Sanchez-Ferandin, S. (2016). *Marinobacter* Dominates the Bacterial Community of the *Ostreococcus tauri* Phycosphere in Culture. *Frontiers in Microbiology* 7, 1414.
- Lupette, J., and Maréchal, E. (2018). Phytoplankton Glycerolipids: Challenging but Promising Prospects from Biomedicine to Green Chemistry and Biofuels. *In Blue Biotechnology : Production and use of marine molecules*. S. La Barre & S.S. Bates (Eds) (Wiley, VCH). pp:191-215.
- Lupette, J., Jaussaud, A., Vigor, C., Oger, C., Galano, J.-M., Reversat, G., Vercauteren, J., Jouhet, J., Durand, T., and Marechal, E. (2018). Non-enzymatic synthesis of bioactive isoprostanoids in the diatom *Phaeodactylum* following oxidative stress. *Plant Physiology* 178,1344-1357.
- ## M
- Ma, Y.-H., Wang, X., Niu, Y.-F., Yang, Z.-K., Zhang, M.-H., Wang, Z.-M., Yang, W.-D., Liu, J.-S., and Li, H.-Y. (2014). Antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase promotes the neutral lipid accumulation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Microbial Cell Factories* 13, 100.
- Maat, D.S., Bale, N.J., Hopmans, E.C., Baudoux, A.C., Damsté, J.S.S., Schouten, S., and Brussaard, C.P.D. (2014). Acquisition of intact polar lipids from the prymnesiophyte *Phaeocystis globosa* by its lytic virus PgV-07T. *Biogeosciences* 11 185-194.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., and Harvey, L.M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249-270.
- Madrigal-Matute, J., and Cuervo, A.M. (2016). Regulation of liver metabolism by autophagy. *Gastroenterology* 150, 328-339.
- Maeda, Y., Nojima, D., Yoshino, T., and Tanaka, T. (2017). Structure and properties of oil bodies in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372.
- Maeda, Y., Sunaga, Y., Yoshino, T., and Tanaka, T. (2014). Oleosome-Associated Protein of the Oleaginous Diatom *Fistulifera solaris* Contains an Endoplasmic Reticulum-Targeting Signal Sequence. *Marine Drugs* 12, 3892-3903.
- Magré, J., Delépine, M., Khallouf, E., Gedde-Dahl Jr, T., Van Maldergem, L., Sobel, E., Papp, J., Meier, M., Mégarbané, A., B.W.G., et al. (2001). Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nature Genetics* 28, 365.
- Malchow, D., Lüderitz, O., Westphal, O., Gerisch, G., and Riedel, V. (1967). Polysaccharide in vegetativen und aggregationsreifen Amöben von *Dictyostelium discoideum*. *European Journal of Biochemistry* 2, 469-479.
- Malhas, A., Goulbourne, C., and Vaux, D.J. (2011). The nucleoplasmic reticulum: form and function. *Trends in Cell Biology* 21, 362-373.
- Mandard, S., Müller, M., and Kersten, S. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61, 393-416.

Références Bibliographiques

- Mann, M., Serif, M., Jakob, T., Kroth, P.G., and Wilhelm, C. (2017). PtAUREO1a and PtAUREO1b knockout mutants of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* are blocked in photoacclimation to blue light. *Journal of Plant Physiology* 217, 44-48.
- Maréchal, E., Roy, S., and Lafanechère, L. (2011). The pharmacological screening process: the small molecule, the biological Screen, the robot, the signal and the information. In *Chemogenomics and Chemical Genetics: A User's Introduction for Biologists, Chemists and Informaticians*, E. Marechal, S. Roy and L. Lafanechère, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 7-21.
- Maréchal, E. (2018a). Primary Endosymbiosis: Emergence of the Primary Chloroplast and the Chromatophore, Two Independent Events. In *Plastids: Methods and Protocols*, E. Maréchal, ed. (New York, NY: Springer US), pp. 3-16.
- Maréchal, E. (2018b). Biocarburants : l'avenir est-il aux microalgues ? In *Encyclopédie de l'environnement*.
- Marin, B., M. Nowack, E.C., and Melkonian, M. (2005). A Plastid in the Making: Evidence for a Second Primary Endosymbiosis. *Protist* 156, 425-432.
- Marlowe, I.T., Brassell, S.C., Eglinton, G., and Green, J.C. (1984a). Long chain unsaturated ketones and esters in living algae and marine sediments. *Organic Geochemistry* 6, 135-141.
- Marlowe, I.T., Green, J.C., Neal, A.C., Brassell, S.C., Eglinton, G., and Course, P.A. (1984b). Long chain (n-C37–C39) alkenones in the Prymnesiophyceae. Distribution of alkenones and other lipids and their taxonomic significance. *British Phycological Journal* 19, 203-216.
- Marshall, R.S., Li, F., Gemperline, D.C., Book, A.J., and Vierstra, R.D. (2015). Autophagic Degradation of the 26S Proteasome Is Mediated by the Dual ATG8/Ubiqutin Receptor RPN10 in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 58, 1053-1066.
- Martens, S., and McMahon, H.T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 543.
- Martin, P., Van Mooy, B.A.S., Heithoff, A., and Dyhrman, S.T. (2011). Phosphorus supply drives rapid turnover of membrane phospholipids in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *The ISME journal* 5, 1057-1060.
- Martinez-Botas, J., Anderson, J.B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B.H.-J., Quast, M.J., Gorenstein, D., Chen, K.-H., and Chan, L. (2000). Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr^{db/db}* mice. *Nature Genetics* 26, 474.
- Martino, A.D., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., and Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions1. *Journal of Phycology* 43, 992-1009.
- McManaman, J.L., Bales, E.S., Orlicky, D.J., Jackman, M., MacLean, P.S., Cain, S., Crunk, A.E., Mansur, A., Graham, C.E., Bowman, T.A., et al. (2013). Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *Journal of Lipid Research* 54, 1346-1359.
- Medipally, S.R., Yusoff, F.M., Banerjee, S., and Shariff, M. (2015). Microalgae as Sustainable Renewable Energy Feedstock for Biofuel Production. *BioMed Research International* 2015, 519513.
- Meesapyodsuk, D., and Qiu, X. (2011). A Peroxygenase Pathway Involved in the Biosynthesis of Epoxy Fatty Acids in Oat. *Plant Physiology* 157, 454-463.
- Mekhalfi, M., Avilan, L., Lebrun, R., Botebol, H., and Gontero, B. (2012). Consequences of the presence of 24-epibrassinolide, on cultures of a diatom, *Asterionella formosa*. *Biochimie* 94, 1213-1220.
- Melo, R.C.N., and Weller, P.F. (2016). Lipid droplets in Leukocytes: organelles linked to inflammatory responses. *Experimental cell research* 340, 193-197.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., et al. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* (New York, N.Y.) 318, 245-250.
- Meyer, H., Bug, M., and Bremer, S. (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature Cell Biology* 14, 117.
- Michaud, M., Gros, V., Tardif, M., Brugière, S., Ferro, M., Prinz, William A., Toulmay, A., Mathur, J., Wozny, M., Falconet, D., et al. (2016). AtMic60 Is Involved in Plant Mitochondria Lipid Trafficking and Is Part of a Large Complex. *Current Biology* 26, 627-639.
- Miranda, D.A., Kim, J.-H., Nguyen, L.N., Cheng, W., Tan, B.C., Goh, V.J., Tan, J.S.Y., Yaligar, J., Kn, B.P., Velan, S.S., et al. (2014). Fat Storage-inducing Transmembrane Protein 2 Is Required for Normal Fat Storage in Adipose Tissue. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 9560-9572.
- Mishra, M., Arukha, A.P., Bashir, T., Yadav, D., and Prasad, G.B.K.S. (2017). All New Faces of Diatoms: Potential Source of Nanomaterials and Beyond. *Frontiers in Microbiology* 8, 1239.

Références Bibliographiques

- Missaglia, S., Valadares, E.R., Moro, L., Fagundes, E.D.T., quintão Roque, R., Giardina, B., and Tavian, D. (2014). Early onset of Chanarin-Dorfman syndrome with severe liver involvement in a patient with a complex rearrangement of ABHD5 promoter. *BMC Medical Genetics* 15, 32-32.
- Miura, S., Gan, J.-W., Brzostowski, J., Parisi, M.J., Schultz, C.J., Londos, C., Oliver, B., and Kimmel, A.R. (2002). Functional Conservation for Lipid Storage Droplet Association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related Proteins in Mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 32253-32257.
- Miyahara, M., Aoi, M., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y., and Ifuku, K. (2013). Highly Efficient Transformation of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* by Multi-Pulse Electroporation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77, 874-876.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* 9, 1089.
- Moellering, E.R., and Benning, C. (2010). RNA Interference Silencing of a Major Lipid Droplet Protein Affects Lipid Droplet Size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 9, 97-106.
- Moessinger, C., Kuerschner, L., Spandl, J., Shevchenko, A., and Thiele, C. (2011). Human Lysophosphatidylcholine Acyltransferases 1 and 2 Are Located in Lipid Droplets Where They Catalyze the Formation of Phosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 21330-21339.
- Moore, H.-P.H., Silver, R.B., Mottillo, E.P., Bernlohr, D.A., and Granneman, J.G. (2005). Perilipin Targets a Novel Pool of Lipid Droplets for Lipolytic Attack by Hormone-sensitive Lipase. *Journal of Biological Chemistry* 280, 43109-43120.
- Moravcevic, K., Mendrola, J.M., Schmitz, K.R., Wang, Y.-H., Slochower, D., Janmey, P.A., and Lemmon, M.A. (2010). Kinase Associated-1 (KA1) Domains Drive MARK/PAR1 Kinases to Membrane Targets by Binding Acidic Phospholipids. *Cell* 143, 966-977.
- Moriyama, T., Toyoshima, M., Saito, M., Wada, H., and Sato, N. (2018). Revisiting the Algal “Chloroplast Lipid Droplet”: The Absence of an Entity That Is Unlikely to Exist. *Plant Physiology* 176, 1519.
- Moreau, M., Lee, G.I., Wang, Y., Crane, B.R., and Klessig, D.F. (2008). AtNOS/AtNOA1 Is a Functional Arabidopsis thaliana cGTPase and Not a Nitric-oxide Synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 32957-32967.
- Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F., and Roberts, L.J. (1990). A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 9383-9387.
- Możejko-Ciesielska, J., and Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research* 192, 271-282.
- Mühlroth, A., Li, K., Røkke, G., Winge, P., Olsen, Y., Hohmann-Marriott, F.M., Vadstein, O., and Bones, M.A. (2013). Pathways of Lipid Metabolism in Marine Algae, Co-Expression Network, Bottlenecks and Candidate Genes for Enhanced Production of EPA and DHA in Species of Chromista. *Marine Drugs* 11.
- Müller, A.O., Blerch, K.F., Gippert, A.L., and Ischebeck, T. (2016). Tobacco pollen tubes – a fast and easy tool for studying lipid droplet association of plant proteins. *The Plant Journal* 89, 1055-1064.
- Murakami, H., Nobusawa, T., Hori, K., Shimojima, M., and Ohta, H. (2018). Betaine Lipid Is Crucial for Adapting to Low Temperature and Phosphate Deficiency in *Nannochloropsis*. *Plant Physiology* 177, 181-193.
- Murphy, D.J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249, 541-585.
- Murphy, S., Martin, S., and Parton, R.G. (2010). Quantitative Analysis of Lipid Droplet Fusion: Inefficient Steady State Fusion but Rapid Stimulation by Chemical Fusogens. *PLoS ONE* 5, e15030.
- Na, H., Zhang, P., Chen, Y., Zhu, X., Liu, Y., Liu, Y., Xie, K., Xu, N., Yang, F., Yu, Y., et al. (2015). Identification of lipid droplet structure-like/resident proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 2481-2491.
- Najt, C.P., Lwande, J.S., McIntosh, A.L., Senthivayagam, S., Gupta, S., Kuhn, L.A., and Atshaves, B.P. (2014). Structural and Functional Assessment of Perilipin 2 Lipid Binding Domain(s). *Biochemistry* 53, 7051-7066.
- Nchoutmboube, J.A., Viktorova, E.G., Scott, A.J., Ford, L.A., Pei, Z., Watkins, P.A., Ernst, R.K., and Belov, G.A. (2013). Increased Long Chain acyl-Coa Synthetase Activity and Fatty Acid Import Is Linked to Membrane Synthesis for Development of Picornavirus Replication Organelles. *PLoS Pathogens* 9, e1003401.
- Nguyen, H.M., Baudet, M., Cuiñé, S., Adriano, J.-M., Barthe, D., Billon, E., Bruley, C., Beisson, F., Peltier, G., Ferro, M., et al. (2011). Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: With focus on proteins involved in lipid metabolism. *PROTEOMICS* 11, 4266-4273.
- Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Burt, A.D., Martin, C., Pumeekochchai, W., and Toms, G.L. (2006). Association between Hepatitis C Virus and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)/LDL Analyzed in Iodixanol Density Gradients. *Journal of Virology* 80, 2418-2428.

Références Bibliographiques

- Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Martin, C., Lowther, D., Purcell, P.J., King, B.J., Neely, D., and Toms, G.L. (2008). Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size. *The Journal of General Virology* **89**, 2507-2517.
- Nielsen, T.S., and Møller, N. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *Diabetes* **63**, 847.
- Nishino, N., Tamori, Y., Tateya, S., Kawaguchi, T., Shibakusa, T., Mizunoya, W., Inoue, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Matsuki, Y., et al. (2008). FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 2808-2821.
- Niu, T.-K., Pfeifer, A.C., Lippincott-Schwartz, J., and Jackson, C.L. (2005). Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-Sensitive Arf1 Exchange Factor at the Golgi. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 1213-1222.
- Niu, Y.-F., Yang, Z.-K., Zhang, M.-H., Zhu, C.-C., Yang, W.-D., Liu, J.-S., and Li, H.-Y. (2012). Transformation of diatom *Phaeodactylum tricorutum* by electroporation and establishment of inducible selection marker. *BioTechniques* **52**, 1-3.
- Niu, Y.-F., Zhang, M.-H., Li, D.-W., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Bai, W.-B., and Li, H.-Y. (2013). Improvement of Neutral Lipid and Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis by Overexpressing a Type 2 Diacylglycerol Acyltransferase in Marine Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Marine Drugs* **11**, 4558-4569.
- Niu, Y.-F., Wang, X., Hu, D.-X., Balamurugan, S., Li, D.-W., Yang, W.-D., Liu, J.-S., and Li, H.-Y. (2016). Molecular characterization of a glycerol-3-phosphate acyltransferase reveals key features essential for triacylglycerol production in *Phaeodactylum tricorutum*. *Biotechnology for Biofuels* **9**, 60.
- Nobel, A. (1867). Patent number 102. Dynamite or Nobel's gunpowder. (Sweden).
- Nojima, D., Yoshino, T., Maeda, Y., Tanaka, M., Nemoto, M., and Tanaka, T. (2013). Proteomics Analysis of Oil Body-Associated Proteins in the Oleaginous Diatom. *Journal of Proteome Research* **12**, 5293-5301.
- Nolan, S.J., Romano, J.D., and Coppens, I. (2017). Host lipid droplets: An important source of lipids salvaged by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *PLOS Pathogens* **13**, e1006362.
- Nourooz-Zadeh, J., Liu, E.H.C., Ånggård, E.E., and Halliwell, B. (1998). F4-Isoprostanes: A Novel Class of Prostanoids Formed during Peroxidation of Docosahexaenoic Acid (DHA). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **242**, 338-344.
- Nowack, E.C.M., Melkonian, M., and Glöckner, G. (2008). Chromatophore Genome Sequence of *Paulinella* Sheds Light on Acquisition of Photosynthesis by Eukaryotes. *Current Biology* **18**, 410-418.
- Nur, B.G., Gencpinar, P., Yuzbasoglu, A., Emre, S.D., and Mihci, E. (2015). Chanarin-Dorfman syndrome: Genotype-Phenotype Correlation. *European Journal of Medical Genetics* **58**, 238-242.
- Nymark, M., Sharma, A.K., Sparstad, T., Bones, A.M., and Winge, P. (2016). A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Scientific Reports* **6**, 24951.
- O**
- Ogawa, M., Satoh, M., Saijo, M., and Ando, S. (2017). Evaluation of a broad-ranging and convenient enzyme-linked immunosorbent assay using the lysate of infected cells with five serotypes of *Orientia tsutsugamushi*, a causative agent of scrub typhus. *BMC Microbiology* **17**, 7.
- Oh, S.K., Kang, H., Shin, D.H., Yang, J., Chow, K.-S., Yeang, H.Y., Wagner, B., Breiteneder, H., and Han, K.-H. (1999). Isolation, Characterization, and Functional Analysis of a Novel cDNA Clone Encoding a Small Rubber Particle Protein from *Hevea brasiliensis*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 17132-17138.
- Okuda-Shimizu, Y., and Hendershot, L.M. (2007). Characterization of an ERAD pathway for non-glycosylated BiP substrates which requires Herp. *Molecular cell* **28**, 544-554.
- Oliva, J., French, S.W., Li, J., and Bardag-Gorce, F. (2012). Proteasome inhibitor treatment reduced fatty acid, triacylglycerol and cholesterol synthesis. *Experimental and molecular pathology* **93**, 26-34.
- Olzmann, J.A., Kopito, R.R., and Christianson, J.C. (2013a). The Mammalian Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation System. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, 10.1101/cshperspect.a013185 a013185.
- Olzmann, J.A., Richter, C.M., and Kopito, R.R. (2013b). Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 1345-1350.
- Onal, G., Kutlu, O., Gozuacik, D., and Dokmeci Emre, S. (2017). Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids in Health and Disease* **16**, 128.
- Orban, T., Palczewska, G., and Palczewski, K. (2011). Retinyl Ester Storage Particles (Retinosomes) from the Retinal Pigmented Epithelium Resemble Lipid Droplets in Other Tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 17248-17258.

Références Bibliographiques

Orlicky, D.J., DeGala, G., Greenwood, C., Bales, E.S., Russell, T.D., and McManaman, J.L. (2008). Multiple functions encoded by the N-terminal PAT domain of adipophilin. *Journal of cell science* *121*, 2921-2929.

Oudot-Le Secq, M.-P., Grimwood, J., Shapiro, H., Armbrust, E.V., Bowler, C., and Green, B.R. (2007). Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage. *Molecular Genetics and Genomics* *277*, 427-439.

P

Paar, M., Jüngst, C., Steiner, N.A., Magnes, C., Sinner, F., Kolb, D., Lass, A., Zimmermann, R., Zumbusch, A., Kohlwein, S.D., et al. (2012). Remodeling of Lipid Droplets during Lipolysis and Growth in Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* *287*, 11164-11173.

Pacher, P., Nivorozhkin, A., and Szabó, C. (2006). Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacological reviews* *58*, 87-114.

Palmer, D.J., Helms, J.B., Beckers, C.J., Orci, L., and Rothman, J.E. (1993). Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *Journal of Biological Chemistry* *268*, 12083-12089.

Pan, R., Reumann, S., Lisik, P., Tietz, S., Olsen, L.J., and Hu, J. (2018). Proteome analysis of peroxisomes from dark-treated senescent *Arabidopsis* leaves. *Journal of Integrative Plant Biology*.

Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresee, J.S., and Glass, R.I. (2006). Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* *12*, 304-306.

Parchmann, S., and Mueller, M.J. (1998). Evidence for the Formation of Dinor Isoprostanes E1 from α -Linolenic Acid in Plants. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 32650-32655.

Park, S., Gidda, S.K., James, C.N., Horn, P.J., Khoo, N., Seay, D.C., Keereetaweep, J., Chapman, K.D., Mullen, R.T., and Dyer, J.M. (2013). The α/β Hydrolase CGI-58 and Peroxisomal Transport Protein PXA1 Coregulate Lipid Homeostasis and Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* *25*, 1726-1739.

Park, S., Keereetaweep, J., James, C.N., Gidda, S.K., Chapman, K.D., Mullen, R.T., and Dyer, J.M. (2014). CGI-58, a key regulator of lipid homeostasis and signaling in plants, also regulates polyamine metabolism. *Plant Signaling & Behavior* *9*, e27723.

Pasaribu, B., Lin, I.P., Chen, C.-S., Lu, C.-Y., and Jiang, P.-L. (2014a). Nutrient limitation in *Auxenochlorella protothecoides* induces qualitative changes of fatty acid and expression of caleosin as a membrane protein associated with oil bodies. *Biotechnology Letters* *36*, 175-180.

Pasaribu, B., Lin, I.P., Tzen, J.T.C., Jauh, G.-Y., Fan, T.-Y., Ju, Y.-M., Cheng, J.-O., Chen, C.-S., and Jiang, P.-L. (2014b). SLDP: a Novel Protein Related to Caleosin Is Associated with the Endosymbiotic Symbiodinium Lipid Droplets from *Euphyllia glabrescens*. *Marine Biotechnology* *16*, 560-571.

Paul, A., Chan, L., and Bickel, P.E. (2008). The PAT Family of Lipid Droplet Proteins in Heart and Vascular Cells. *Current hypertension reports* *10*, 461-466.

Pejchar, P., Potocký, M., Novotná, Z., Veselková, Š., Kocourková, D., Valentová, O., Schwarzerová, K., and Martinec, J. (2010). Aluminium ions inhibit the formation of diacylglycerol generated by phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in tobacco cells. *New Phytologist* *188*, 150-160.

Peled, E., Leu, S., Zarka, A., Weiss, M., Pick, U., Khozin-Goldberg, I., and Boussiba, S. (2011). Isolation of a Novel Oil Globule Protein from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*). *Lipids* *46*, 851-861.

Peng, S.-E., Chen, W.-N.U., Chen, H.-K., Lu, C.-Y., Mayfield, A.B., Fang, L.-S., and Chen, C.-S. (2011). Lipid bodies in coral-dinoflagellate endosymbiosis: Proteomic and ultrastructural studies. *PROTEOMICS* *11*, 3540-3555.

Peoples, O.P., and Sinskey, A.J. (1989). Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding beta-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *Journal of Biological Chemistry* *264*, 15293-15297.

Perera, R., Riley, C., Isaac, G., Hopf-Jannasch, A.S., Moore, R.J., Weitz, K.W., Pasa-Tolic, L., Metz, T.O., Adamec, J., and Kuhn, R.J. (2012). Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. *PLoS Pathogens* *8*, e1002584.

Pericleous, M., Kelly, C., Wang, T., Livingstone, C., and Ala, A. (2017). Wolman's disease and cholesteryl ester storage disorder: the phenotypic spectrum of lysosomal acid lipase deficiency. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* *2*, 670-679.

Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L.-J., Bastien, O., Rébeillé, F., Jouhet, J., Falconet, D., Block, M.A., McFadden, G.I., et al. (2014). Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways – From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research* *54*, 68-85.

Références Bibliographiques

- Philip, S., Keshavarz, T., and Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 82, 233-247.
- Pittera, J., Jouhet, J., Breton, S., Garczarek, L., Partensky, F., Maréchal, É., Nguyen, N.A., Doré, H., Ratin, M., Pitt, F.D., et al. (2017). Thermoacclimation and genome adaptation of the membrane lipidome in marine *Synechococcus*. *Environmental Microbiology* 20, 612-631.
- Pol, A., Gross, S.P., and Parton, R.G. (2014). Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *The Journal of Cell Biology* 204, 635-646.
- Popko, J., Herrfurth, C., Feussner, K., Ischebeck, T., Iven, T., Haslam, R., Hamilton, M., Sayanova, O., Napier, J., Khozin-Goldberg, I., et al. (2016). Metabolome Analysis Reveals Betaine Lipids as Major Source for Triglyceride Formation, and the Accumulation of Sedoheptulose during Nitrogen-Starvation of *Phaeodactylum tricorutum*. *PLOS ONE* 11, e0164673.
- Popluechai, S., Froissard, M., Jolivet, P., Breviaro, D., Gatehouse, A.M.R., O'Donnell, A.G., Chardot, T., and Kohli, A. (2011). *Jatropha curcas* oil body proteome and oleosins: L-form JcOle3 as a potential phylogenetic marker. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 352-356.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., and Kriedemann, P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 975, 384-394.
- Pötter, M., and Steinbüchel, A. (2006). Biogenesis and Structure of Polyhydroxyalkanoate Granules. In *Inclusions in Prokaryotes*, J.M. Shively, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 109-136.
- Poulsen, L.I.C., Siersbæk, M., and Mandrup, S. (2012). PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23, 631-639.
- Prud'homme, M.-P., and Moore, T.S. (1992). Phosphatidylcholine Synthesis in Castor Bean Endosperm. *Free Bases as Intermediates* 100, 1527-1535.
- Pulz, O., and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 635-648.
- Pyc, M., Cai, Y., Gidda, S.K., Yurchenko, O., Park, S., Kretschmar, F.K., Ischebeck, T., Valerius, O., Braus, G.H., Chapman, K.D., et al. (2017). Arabidopsis lipid droplet-associated protein (LDAP) – interacting protein (LDIP) influences lipid droplet size and neutral lipid homeostasis in both leaves and seeds. *The Plant Journal* 92, 1182-1201.
- ### Q
- Qi, J., Lang, W., Geisler, J.G., Wang, P., Petrounia, I., Mai, S., Smith, C., Askari, H., Struble, G.T., Williams, R., et al. (2012). The use of stable isotope-labeled glycerol and oleic acid to differentiate the hepatic functions of DGAT1 and -2. *Journal of Lipid Research* 53, 1106-1116.
- Qu, R., Wang, S.M., Lin, Y.H., Vance, V.B., and Huang, A.H. (1986). Characteristics and biosynthesis of membrane proteins of lipid bodies in the scutella of maize (*Zea mays* L.). *Biochemical Journal* 235, 57-65.
- Quettier, A.-L., and Eastmond, P.J. (2009). Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 485-490.
- Quinn, K., and Purcell, S.M. (2017). Lipodystrophies. *StatPearls* [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459180/>
- ### R
- Rabhi, I., Rabhi, S., Ben-Othman, R., Rasche, A., Sysco, C., Daskalaki, A., Trentin, B., Piquemal, D., Regnault, B., Descoteaux, A., et al. (2012). Transcriptomic Signature of *Leishmania* Infected Mice Macrophages: A Metabolic Point of View. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, e1763.
- Rabhi, S., Rabhi, I., Trentin, B., Piquemal, D., Regnault, B., Goyard, S., Lang, T., Descoteaux, A., Enninga, J., and Guizani-Tabbane, L. (2016). Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. *PLoS ONE* 11, e0148640.
- Rainteau, D., Humbert, L., Delage, E., Vergnolle, C., Cantrel, C., Maubert, M.-A., Lanfranchi, S., Maldiney, R., Collin, S., Wolf, C., et al. (2012). Acyl Chains of Phospholipase D Transphosphatidylated Products in *Arabidopsis* Cells: A Study Using Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *PLOS ONE* 7, e41985.
- Rajab, A., Straub, V., McCann, L.J., Seelow, D., Varon, R., Barresi, R., Schulze, A., Lucke, B., Lützkendorf, S., Karbasiyan, M., et al. (2010). Fatal Cardiac Arrhythmia and Long-QT Syndrome in a New Form of Congenital Generalized Lipodystrophy with Muscle Rippling (CGL4) Due to PTRF-CAVIN Mutations. *PLoS Genetics* 6, e1000874.
- Rank, R.G., Whittimore, J., Bowlin, A.K., and Wyrick, P.B. (2011). In Vivo Ultrastructural Analysis of the Intimate Relationship between Polymorphonuclear Leukocytes and the Chlamydial Developmental Cycle. *Infection and Immunity* 79, 3291-3301.

Références Bibliographiques

- Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450, 663.
- Reinecke, F., and Steinbüchel, A. (2009). *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16, 91-108.
- Riekhof, W.R., Naik, S., Bertrand, H., Benning, C., and Voelker, D.R. (2014). Phosphate Starvation in Fungi Induces the Replacement of Phosphatidylcholine with the Phosphorus-Free Betaine Lipid Diacylglycerol-N,N,N-Trimethylhomoserine. *Eukaryotic Cell* 13, 749-757.
- Riekhof, W.R., Sears, B.B., and Benning, C. (2005). Annotation of Genes Involved in Glycerolipid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the Betaine Lipid Synthase BTA1(Cr). *Eukaryotic Cell* 4, 242-252.
- Roberts II, L.J., Montine, T.J., Markesbery, W.R., Tapper, A.R., Hardy, P., Chemtob, S., Dettbarn, W.D., and Morrow, J.D. (1998). Formation of Isoprostane-like Compounds (Neuroprostanes) in Vivo from Docosahexaenoic Acid. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13605-13612.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., and Kaiser, W.M. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* 53, 103-110.
- Roessler, P.G. (1990). Purification and Characterization of Acetyl-CoA Carboxylase from the Diatom *Cyclotella cryptica*. *Plant Physiology* 92, 73-78.
- Rorrer, G.L., Chang, C.-H., Liu, S.-H., Jeffryes, C., Jiao, J., and Hedberg, J.A. (2005). Biosynthesis of Silicon-Germanium Oxide Nanocomposites by the Marine Diatom *Nitzschia frustulum*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 5, 41-49.
- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., and Betenbaugh, M.J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 430-436.
- Rowe, E.R., Mimmack, M.L., Barbosa, A.D., Haider, A., Isaac, I., Ouberaï, M.M., Thiam, A.R., Patel, S., Saudek, V., Siniouoglou, S., et al. (2016). Conserved Amphipathic Helices Mediate Lipid Droplet Targeting of Perilipins 1–3. *The Journal of Biological Chemistry* 291, 6664-6678.
- Ruiz, J., Olivieri, G., de Vree, J., Bosma, R., Willems, P., Reith, J.H., Eppink, M.H.M., Kleinegris, D.M.M., Wijffels, R.H., and Barbosa, M.J. (2016). Towards industrial products from microalgae. *Energy & Environmental Science* 9, 3036-3043.
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J.-P., and Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels* 8, 42.
- Ryall, K., Harper, J.T., and Keeling, P.J. (2003). Plastid-derived Type II fatty acid biosynthetic enzymes in chromists. *Gene* 313, 139-148.
- Rydel, T.J., Williams, J.M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W.C., Brown, S.M., Pershing, J.C., Purcell, J.P., and Alibhai, M.F. (2003). The Crystal Structure, Mutagenesis, and Activity Studies Reveal that Patatin Is a Lipid Acyl Hydrolase with a Ser-Asp Catalytic Dyad. *Biochemistry* 42, 6696-6708.

S

- Safran, S.A. (1994). *Statistical thermodynamics of surfaces, interfaces, and membranes*, (Reading (Mass.) : Addison-Wesley).
- Sahu-Osen, A., Montero-Moran, G., Schittmayer, M., Fritz, K., Dinh, A., Chang, Y.-F., McMahon, D., Boeszoermyenyi, A., Cornaciu, I., Russell, D., et al. (2015). CGI-58/ABHD5 is phosphorylated on Ser239 by protein kinase A: control of subcellular localization. *Journal of Lipid Research* 56, 109-121.
- Saka, H.A., Thompson, J.W., Chen, Y.-S., Dubois, L.G., Haas, J.T., Moseley, A., and Valdivia, R.H. (2015). Chlamydia trachomatis Infection Leads to Defined Alterations to the Lipid Droplet Proteome in Epithelial Cells. *PLoS ONE* 10, e0124630.
- Sakihama, Y., Nakamura, S., and Yamasaki, H. (2002). Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol* 43, 290-297.
- Salo, V.T., Belevich, I., Li, S., Karhinen, L., Vihinen, H., Vigouroux, C., Magré, J., Thiele, C., Hölttä-Vuori, M., Jokitalo, E., et al. (2016). Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. *The EMBO Journal* 35, 2699-2716.
- Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T., and Gamarnik, A.V. (2009). Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLOS Pathogens* 5, e1000632.
- Samuelov, L., Fuchs-Telem, D., Sarig, O., and Sprecher, E. (2011). An exceptional mutational event leading to Chanarin-Dorfman syndrome in a large consanguineous family. *British Journal of Dermatology* 164, 1390-1392.

Références Bibliographiques

- Sando, T., Hayashi, T., Takeda, T., Akiyama, Y., Nakazawa, Y., Fukusaki, E., and Kobayashi, A. (2009). Histochemical study of detailed laticifer structure and rubber biosynthesis-related protein localization in *Hevea brasiliensis* using spectral confocal laser scanning microscopy. *Planta* 230, 215-225.
- Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., and Fernandez, E. (2015). Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in Plant Science* 6, 899.
- Sapriel, G., Quinet, M., Heijde, M., Jourden, L., Tanty, V., Luo, G., Le Crom, S., and Lopez, P.J. (2009). Genome-Wide Transcriptome Analyses of Silicon Metabolism in *Phaeodactylum tricornutum* Reveal the Multilevel Regulation of Silicic Acid Transporters. *PLoS ONE* 4, e7458.
- Sardet, C. (2013). Plancton - Aux origines du vivant.
- Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Natsume, T., Suzuki, T., Shoji, I., Aizaki, H., Miyamura, T., and Nishijima, M. (2006). Proteomic Profiling of Lipid Droplet Proteins in Hepatoma Cell Lines Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. *The Journal of Biochemistry* 139, 921-930.
- Schlegel, H.G., Kaltwasser, H., and Gottschalk, G. (1961). A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. *Archiv fur Mikrobiologie* 38, 209-222.
- Schmuth, M., Elias, P.M., Hanley, K., Lau, P., Moser, A., Willson, T.M., Bikle, D.D., and Feingold, K.R. (2004). The Effect of LXR Activators on AP-1 Proteins in Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 123, 41-48.
- Schneider, G., Guttman, P., Heim, S., Rehbein, S., Mueller, F., Nagashima, K., Heymann, J.B., Müller, W.G., and McNally, J.G. (2010). Three-dimensional cellular ultrastructure resolved by X-ray microscopy. *Nature Methods* 7, 985.
- Schubert, P., Steinbüchel, A., and Schlegel, H.G. (1988). Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 170, 5837-5847.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337.
- Schweiger, M., Paar, M., Eder, C., Brandis, J., Moser, E., Gorkiewicz, G., Grond, S., Radner, F.P.W., Cerk, I., Cornaciu, I., et al. (2012). G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. *Journal of Lipid Research* 53, 2307-2317.
- Senik, S.V., Maloshenok, L.G., Kotlova, E.R., Shavarda, A.L., Moiseenko, K.V., Bruskin, S.A., Koroleva, O.V., and Psurtseva, N.V. (2015). Diacylglyceryltrimethylhomoserine content and gene expression changes triggered by phosphate deprivation in the mycelium of the basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry* 117, 34-42.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R.A., and Rothman, J.E. (1991). ADP-Ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: A novel role for a GTP-binding protein. *Cell* 67, 239-253.
- 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.
- Shemesh, T., Luini, A., Malhotra, V., Burger, K.N.J., and Kozlov, M.M. (2003). Prefission Constriction of Golgi Tubular Carriers Driven by Local Lipid Metabolism: A Theoretical Model. *Biophysical Journal* 85, 3813-3827.
- Shemi, A., Schatz, D., Fredricks, H.F., Van Mooy, B.A.S., Porat, Z., and Vardi, A. (2016). Phosphorus starvation induces membrane remodeling and recycling in *Emiliania huxleyi*. *New Phytologist* 211, 886-898.
- Shen, P., Zhao, Q., Yao, C., Wu, S., Meng, Y., Zhang, L., and Xue, S. (2016). Differential proteome analysis and identification of lipid droplet associated proteins in the marine microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Haptophyta). In The 4th Asia-Oceania Algae Innovation Summit. (Wuhan, China).
- Shen, Y., Xie, J., Liu, R.-d., Ni, X.-f., Wang, X.-h., Li, Z.-x., and Zhang, M. (2014). Genomic analysis and expression investigation of caleosin gene family in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448, 365-371.
- Shi, Q., Araie, H., Bakku, R.K., Fukao, Y., Rakwal, R., Suzuki, I., and Shiraiwa, Y. (2015). Proteomic analysis of lipid body from the alkenone-producing marine haptophyte alga *Tisochrysis lutea*. *Proteomics* 15, 4145-4158.
- Shi, X., Li, J., Zou, X., Greggain, J., Rødkær, S.V., Færgeman, N.J., Liang, B., and Watts, J.L. (2013). Regulation of lipid droplet size and phospholipid composition by stearoyl-CoA desaturase. *Journal of Lipid Research* 54, 2504-2514.
- Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Kondo, M., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y., and Nishimura, M. (2013). Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 4967-4983.
- Shimada, T.L., Takano, Y., Shimada, T., Fujiwara, M., Fukao, Y., Mori, M., Okazaki, Y., Saito, K., Sasaki, R., Aoki, K., et al. (2014). Leaf Oil Body Functions as a Subcellular Factory for the Production of a Phytoalexin in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 164, 105-118.
- Shimada, T.L., and Hara-Nishimura, I. (2015a). Leaf oil bodies are subcellular factories producing antifungal oxylipins. *Current Opinion in Plant Biology* 25, 145-150.

Références Bibliographiques

- Shimada, T.L., Takano, Y., and Hara-Nishimura, I. (2015b). Oil body-mediated defense against fungi: From tissues to ecology. *Plant Signaling & Behavior* 10, e989036.
- Shimojima, M. (2011). Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. *Progress in Lipid Research* 50, 234-239.
- Shin, S.-E., Lim, J.-M., Koh, H.G., Kim, E.K., Kang, N.K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W.-S., Lee, B., Hwangbo, K., et al. (2016). CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports* 6, 27810.
- Siaut, M., Cui n , S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylid s, C., Li-Beisson, Y., et al. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology* 11, 7.
- Siegler, H., Valerius, O., Ischebeck, T., Popko, J., Tourasse, N.J., Vallon, O., Khozin-Goldberg, I., Braus, G.H., and Feussner, I. (2017). Analysis of the lipid body proteome of the oleaginous alga *Lobosphaera incisa*. *BMC Plant Biology* 17, 98.
- Simionato, D., Block, M.A., La Rocca, N., Jouhet, J., Mar chal, E., Finazzi, G., and Morosinotto, T. (2013). The Response of *Nannochloropsis gaditana* to Nitrogen Starvation Includes De Novo Biosynthesis of Triacylglycerols, a Decrease of Chloroplast Galactolipids, and Reorganization of the Photosynthetic Apparatus. *Eukaryotic Cell* 12, 665-676.
- Simon, M.L.A., Platre, M.P., Assil, S., van Wijk, R., Chen, W.Y., Chory, J., Dreux, M., Munnik, T., and Jaillais, Y. (2014). A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 77, 322-337.
- Simon, M.L.A., Platre, M.P., Marqu s-Bueno, M.M., Armengot, L., Stanislas, T., Bayle, V., Caillaud, M.-C., and Jaillais, Y. (2016). A PI4P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signaling in plants. *Nature plants* 2, 16089-16089.
- Simopoulos, A.P. (2009). Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Rev. Nutr. Diet.* 99, 1-16.
- Singer, A., Poschmann, G., M hlich, C., Valadez-Cano, C., H nsch, S., H ren, V., Rensing, S.A., St hler, K., and Nowack, E.C.M. (2017). Massive Protein Import into the Early-Evolutionary-Stage Photosynthetic Organelle of the Amoeba *Paulinella chromatophora*. *Current Biology* 27, 2763-2773.e2765.
- Skinner, J.R., Harris, L.-A.L.S., Shew, T.M., Abumrad, N.A., and Wolins, N.E. (2013). Perilipin 1 moves between the fat droplet and the endoplasmic reticulum. *Adipocyte* 2, 80-86.
- Slater, S.C., Voige, W.H., and Dennis, D.E. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* 170, 4431-4436.
- Slattery, S.S., Diamond, A., Wang, H., Therrien, J.A., Lant, J.T., Jazey, T., Lee, K., Klassen, Z., Desgagn -Penix, I., Karas, B.J., et al. (2018). An Expanded Plasmid-Based Genetic Toolbox Enables Cas9 Genome Editing and Stable Maintenance of Synthetic Pathways in *Phaeodactylum tricornutum*. *ACS Synthetic Biology* 7, 328-338.
- Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J.-C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F.J., Bravo, J., et al. (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research* 34, e149-e149.
- Smith, S.J., Cases, S., Jensen, D.R., Chen, H.C., Sande, E., Tow, B., Sanan, D.A., Raber, J., Eckel, R.H., and Farese Jr, R.V. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nature Genetics* 25, 87.
- Soni, K.G., Mardones, G.A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C.L., and Bonifacino, J.S. (2009). Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *Journal of Cell Science* 122, 1834.
- Sonnhammer, E.L.L., Heijne, A.G.v., and Krogh, A.A. (1998). A Hidden Markov Model for Predicting Transmembrane Helices in Protein Sequences. In *Proceedings of the 6th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. pp. 175-182.
- S reng, K., Neufeld, T.P., and Simonsen, A. (2018). Chapter One - Membrane Trafficking in Autophagy. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Volume 336, L. Galluzzi, ed. (Academic Press), pp. 1-92.
- Soulages, J.L., Firdaus, S.J., Hartson, S., Chen, X., Howard, A.D., and Arrese, E.L. (2012). Developmental changes in the protein composition of *Manduca sexta* lipid droplets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42, 305-320.
- Souza, S.C., de Vargas, L.M., Yamamoto, M.T., Lien, P., Franciosa, M.D., Moss, L.G., and Greenberg, A.S. (1998). Overexpression of Perilipin A and B Blocks the Ability of Tumor Necrosis Factor α to Increase Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273, 24665-24669.
- Stenson, B.M., Ryd n, M., Venteclef, N., Dahlman, I., Pettersson, A.M.L., Mairal, A.,  str m, G., Blomqvist, L., Wang, V., Jocken, J.W.E., et al. (2011). Liver X Receptor (LXR) Regulates Human Adipocyte Lipolysis. *Journal of Biological Chemistry* 286, 370-379.
- Stevenson, J., Huang, E.Y., and Olzmann, J.A. (2016). Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Lipid Homeostasis. *Annual Review of Nutrition* 36, 511-542.

Références Bibliographiques

- Stohr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R., and Rockel, P. (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212, 835-841.
- Stone, S.J., Myers, H.M., Watkins, S.M., Brown, B.E., Feingold, K.R., Elias, P.M., and Farese, R.V. (2004). Lipopenia and Skin Barrier Abnormalities in DGAT2-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry* 279, 11767-11776.
- Stone, S.J., Levin, M.C., and Farese, R.V. (2006). Membrane Topology and Identification of Key Functional Amino Acid Residues of Murine Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase-2. *Journal of Biological Chemistry* 281, 40273-40282.
- Stone, S.J., Levin, M.C., Zhou, P., Han, J., Walther, T.C., and Farese, R.V. (2009). The Endoplasmic Reticulum Enzyme DGAT2 Is Found in Mitochondria-associated Membranes and Has a Mitochondrial Targeting Signal That Promotes Its Association with Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 5352-5361.
- Streeper, R.S., Grueter, C.A., Salomonis, N., Cases, S., Levin, M.C., Koliwad, S.K., Zhou, P., Hirschey, M.D., Verdin, E., and Farese, R.V. (2012). Deficiency of the lipid synthesis enzyme, DGAT1, extends longevity in mice. *Aging (Albany NY)* 4, 13-27.
- Stubbe, J., and Tian, J. (2003). Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Natural Product Reports* 20, 445-457.
- Stukenberg, D., Zauner, S., Dell'Aquila, G., and Maier, U.G. (2018). Optimizing CRISPR/Cas9 for the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Frontiers in Plant Science* 9, 740.
- Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A.W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M.P., et al. (2004). Perilipin A Mediates the Reversible Binding of CGI-58 to Lipid Droplets in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279, 42062-42071.
- Sun, Z., Gong, J., Wu, H., Xu, W., Wu, L., Xu, D., Gao, J., Wu, J.-w., Yang, H., Yang, M., et al. (2013). Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes. *Nature Communications* 4, 1594.
- Suzuki, M., Otsuka, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Taniguchi, T., Hashimoto, H., Taniguchi, H., and Fujimoto, T. (2012). Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets. *Molecular Biology of the Cell* 23, 800-810.
- Sznajder, A., and Jendrossek, D. (2014). To Be or Not To Be a Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase: PhaZd1 (PhaZ6) and PhaZd2 (PhaZ7) of *Ralstonia eutropha*, Highly Active PHB Depolymerases with No Detectable Role in Mobilization of Accumulated PHB. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 4936-4946.
- Sznajder, A., Pfeiffer, D., and Jendrossek, D. (2015). Comparative Proteome Analysis Reveals Four Novel Polyhydroxybutyrate (PHB) Granule-Associated Proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 1847-1858.
- Szymanski, K.M., Binns, D., Bartz, R., Grishin, N.V., Li, W.-P., Agarwal, A.K., Garg, A., Anderson, R.G.W., and Goodman, J.M. (2007). The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 20890-20895.
- ## T
- Talbott, H., and Davis, J.S. (2017). Lipid Droplets and Metabolic Pathways Regulate Steroidogenesis in the Corpus Luteum. In *The Life Cycle of the Corpus Luteum*, R. Meidan, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 57-78.
- Tang, W.-C., Lin, R.-J., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2014). Rab18 Facilitates Dengue Virus Infection by Targeting Fatty Acid Synthase to Sites of Viral Replication. *Journal of Virology* 88, 6793-6804.
- Tanner, J.E., and Stejskal, E.O. (1968). Restricted Self-Diffusion of Protons in Colloidal Systems by the Pulsed-Gradient, Spin-Echo Method. *The Journal of Chemical Physics* 49, 1768-1777.
- Tansey, J.T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D.L., Zee, J.V., Gavrilova, O., Reitman, M.L., Deng, C.X., Li, C., Kimmel, A.R., et al. (2001). Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 6494.
- Targett-Adams, P., McElwee, M.J., Ehrenborg, E., Gustafsson, M.C., Palmer, C.N., and McLauchlan, J. (2005). A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1728, 95-104.
- Tariq, A., Hameed, A., Bokhari, H., and Masood, F. (2015). Is atomic rearrangement of type IV PHA synthases responsible for increased PHA production? *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 33, 1225-1238.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., and Fujimoto, T. (2002). The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44507-44512.
- Taurino, M., Costantini, S., De Domenico, S., Stefanelli, F., Ruano, G., Delgadillo, M.O., Sanchez-Serrano, J.J., Sanmartín, M., Santino, A., and Rojo, E. (2017). SEIPIN proteins mediate lipid droplet biogenesis to promote pollen transmission and reduce seed dormancy. *Plant Physiology*.

Références Bibliographiques

- Thazar-Poulot, N., Miquel, M., Fobis-Loisy, I., and Gaude, T. (2015). Peroxisome extensions deliver the Arabidopsis SDP1 lipase to oil bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 4158-4163.
- Theodoulou, F.L., Job, K., Slocombe, S.P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T.R., and Graham, I.A. (2005). Jasmonic Acid Levels Are Reduced in COMATOSE ATP-Binding Cassette Transporter Mutants. Implications for Transport of Jasmonate Precursors into Peroxisomes. *Plant Physiology* *137*, 835-840.
- Theriot, E.C., Ashworth, M., Ruck, E., Nakov, T., and Jansen, R.K. (2010). A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution* *143*, 278-296.
- Thiam, A.R., Antonny, B., Wang, J., Delacotte, J., Wilfling, F., Walther, T.C., Beck, R., Rothman, J.E., and Pincet, F. (2013a). COPI buds 60-nm lipid droplets from reconstituted water-phospholipid-triacylglyceride interfaces, suggesting a tension clamp function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 13244-13249.
- Thiam, A.R., Farese Jr, R.V., and Walther, T.C. (2013b). The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *14*, 775.
- Thiam, A.R., and Pincet, F. (2015). The Energy of COPI for Budding Membranes. *PLoS ONE* *10*, e0133757.
- Thiam, A.R., and Forêt, L. (2016). The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* *1861*, 715-722.
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K.H., Köchel, H.G., and Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with β -lipoprotein. *Medical Microbiology and Immunology* *181*, 293-300.
- Thul, P.J., Tschapalda, K., Kolkhof, P., Thiam, A.R., Oberer, M., and Beller, M. (2017). Targeting of the *Drosophila* protein CG2254/Ldsdh1 to a subset of lipid droplets. *Journal of Cell Science* *130*, 3141.
- Tian, Y., Bi, J., Shui, G., Liu, Z., Xiang, Y., Liu, Y., Wenk, M.R., Yang, H., and Huang, X. (2011). Tissue-Autonomous Function of *Drosophila* Seipin in Preventing Ectopic Lipid Droplet Formation. *PLoS Genetics* *7*, e1001364.
- Tirajoh, A., Aung, T.S.T., McKay, A.B., and Plant, A.L. (2005). Stress-responsive α -dioxygenase expression in tomato roots. *Journal of Experimental Botany* *56*, 713-723.
- Tirapelle, E.F., Müller-Santos, M., Tadra-Sfeir, M.Z., Kadowaki, M.A.S., Steffens, M.B.R., Monteiro, R.A., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., and Chubatsu, L.S. (2013). Identification of Proteins Associated with Polyhydroxybutyrate Granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 - Old Partners, New Players. *PLoS ONE* *8*, e75066.
- Tnani, H., López, I., Jouenne, T., and Vicent, C.M. (2011). Protein composition analysis of oil bodies from maize embryos during germination. *Journal of Plant Physiology* *168*, 510-513.
- Tobin, K.A.R., Harsem, N.K., Dalen, K.T., Staff, A.C., Nebb, H.I., and Duttaroy, A.K. (2006). Regulation of ADRP expression by long-chain polyunsaturated fatty acids in BeWo cells, a human placental choriocarcinoma cell line. *Journal of Lipid Research* *47*, 815-823.
- Tomčala, A., Kyselová, V., Schneedorferová, I., Opekarová, I., Moos, M., Urajová, P., Kručinská, J., and Oborník, M. (2017). Separation and identification of lipids in the photosynthetic cousins of Apicomplexa *Chromera velia* and *Vitrella brassicaformis*. *Journal of Separation Science* *40*, 3402-3413.
- Trentacoste, E.M., Shrestha, R.P., Smith, S.R., Glé, C., Hartmann, A.C., Hildebrand, M., and Gerwick, W.H. (2013). Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 19748-19753.
- Turró, S., Ingelmo-Torres, M., Estanyol, J.M., Tebar, F., Fernández, M.A., Albor, C.V., Gaus, K., Grewal, T., Enrich, C., and Pol, A. (2006). Identification and Characterization of Associated with Lipid Droplet Protein 1: A Novel Membrane-Associated Protein That Resides on Hepatic Lipid Droplets. *Traffic* *7*, 1254-1269.

U

- Uchino, K., Saito, T., and Jendrossek, D. (2008). Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase PhaZa1 Is Involved in Mobilization of Accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology* *74*, 1058-1063.
- Ullmann, A., Jacob, F., and Monod, J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* *24*, 339-343.
- Umlauf, E., Csaszar, E., Moertelmaier, M., Schuetz, G.J., Parton, R.G., and Prohaska, R. (2004). Association of Stomatins with Lipid Bodies. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 23699-23709.
- Unterstab, G., Gosert, R., Leuenberger, D., Lorentz, P., Rinaldo, C.H., and Hirsch, H.H. (2010). The polyomavirus BK agnoprotein co-localizes with lipid droplets. *Virology* *399*, 322-331.

Références Bibliographiques

Upadhyaya, A., and Sheetz, M.P. (2004). Tension in Tubulovesicular Networks of Golgi and Endoplasmic Reticulum Membranes. *Biophysical Journal* **86**, 2923-2928.

V

Van Mooy, B.A.S., Fredricks, H.F., Pedler, B.E., Dyhrman, S.T., Karl, D.M., Koblížek, M., Lomas, M.W., Mincer, T.J., Moore, L.R., Moutin, T., et al. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* **458**, 69.

Van Wijk, K.J., and Kessler, F. (2017). Plastoglobuli: Plastid Microcompartments with Integrated Functions in Metabolism, Plastid Developmental Transitions, and Environmental Adaptation. *Annual Review of Plant Biology* **68**, 253-289.

Vance, V.B., and Huang, A.H. (1987). The major protein from lipid bodies of maize. Characterization and structure based on cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 11275-11279.

Vardi, A., Formiggini, F., Casotti, R., De Martino, A., Ribalet, F., Miralto, A., and Bowler, C. (2006). A Stress Surveillance System Based on Calcium and Nitric Oxide in Marine Diatoms. *PLOS Biology* **4**, e60.

Vardi, A., Bidle, K.D., Kwityn, C., Hirsh, D.J., Thompson, S.M., Callow, J.A., Falkowski, P., and Bowler, C. (2008). A Diatom Gene Regulating Nitric-Oxide Signaling and Susceptibility to Diatom-Derived Aldehydes. *Current Biology* **18**, 895-899.

Varela, G.M., Antwi, D.A., Dhir, R., Yin, X., Singhal, N.S., Graham, M.J., Crooke, R.M., and Ahima, R.S. (2008). Inhibition of ADRP prevents diet-induced insulin resistance. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **295**, G621-G628.

Vermachova, M., Purkrtova, Z., Santrucek, J., Jolivet, P., Chardot, T., and Kodicek, M. (2011). New protein isoforms identified within *Arabidopsis thaliana* seed oil bodies combining chymotrypsin/trypsin digestion and peptide fragmentation analysis. *PROTEOMICS* **11**, 3430-3434.

Vieler, A., Brubaker, S.B., Vick, B., and Benning, C. (2012a). A Lipid Droplet Protein of *Nannochloropsis* with Functions Partially Analogous to Plant Oleosins. *Plant Physiology* **158**, 1562.

Vieler, A., Wu, G., Tsai, C.-H., Bullard, B., Cornish, A.J., Harvey, C., Reca, I.-B., Thornburg, C., Achawanantakun, R., Buehl, C.J., et al. (2012b). Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genetics* **8**, e1003064.

Vinayak, V., Manoylov, K.M., Gateau, H., Blanckaert, V., Hérault, J., Pencreac'h, G., Marchand, J., Gordon, R., and Schoefs, B. (2015). Diatom Milking: A Review and New Approaches. *Marine Drugs* **13**, 2629-2665.

Voitsekhovskaja, O.V., Schiermeyer, A., and Reumann, S. (2014). Plant peroxisomes are degraded by starvation-induced and constitutive autophagy in tobacco BY-2 suspension-cultured cells. *Frontiers in Plant Science* **5**, 629.

Voytas, D.F. (2013). Plant Genome Engineering with Sequence-Specific Nucleases. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 327-350.

Voytas, D.F., and Gao, C. (2014). Precision Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Regulatory Challenges. *PLoS Biology* **12**, e1001877.

Vrablik, T.L., Petyuk, V.A., Larson, E.M., Smith, R.D., and Watts, J.L. (2015). Lipidomic and proteomic analysis of *C. elegans* lipid droplets and identification of ACS-4 as a lipid droplet-associated protein. *Biochimica et biophysica acta* **1851**, 1337-1345.

W

Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., and Makino, A. (2009). Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology* **149**, 885-893.

Waheed, N., Cheema, H.A., Suleman, H., Mushtaq, I., and Fayyaz, Z. (2016). Chanarin-Dorfman Syndrome. *J Coll Physicians Surg Pak* **26**, 787-789.

Waltermann, M., and Steinbüchel, A. (2005). Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure, Formation, and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots. *Journal of Bacteriology* **187**, 3607-3619.

Walther, T.C., Chung, J., and Farese, R.V. (2017). Lipid Droplet Biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **33**, 491-510.

Wan, H.-C., Melo, R.C.N., Jin, Z., Dvorak, A.M., and Weller, P.F. (2007). Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 167-178.

Wanders, R.J.A., Waterham, H.R., and Ferdinandusse, S. (2015). Metabolic Interplay between Peroxisomes and Other Subcellular Organelles Including Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **3**, 83.

Wang, H., Becuwe, M., Housden, B.E., Chitraju, C., Porras, A.J., Graham, M.M., Liu, X.N., Thiam, A.R., Savage, D.B., Agarwal, A.K., et al. (2016). Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *eLife* **5**, e16582.

Références Bibliographiques

- Wang, P., Mugume, Y., and Bassham, D.C. (2018). New advances in autophagy in plants: Regulation, selectivity and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 80, 113-122.
- Wang, Q., Lu, Y., Xin, Y., Wei, L., Huang, S., and Xu, J. (2016). Genome editing of model oleaginous microalgae *Nannochloropsis* spp. by CRISPR/Cas9. *The Plant Journal* 88, 1071-1081.
- Wang, Q., Tappel, R.C., Zhu, C., and Nomura, C.T. (2012). Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 519.
- Wang, W., Wei, S., Li, L., Su, X., Du, C., Li, F., Geng, B., Liu, P., and Xu, G. (2015). Proteomic analysis of murine testes lipid droplets. *Scientific Reports* 5, 12070.
- Wasternack, C., and Feussner, I. (2018). The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annual Review of Plant Biology* 69, 363-386.
- Watanabe, T., Sakiyama, R., Iimi, Y., Sekine, S., Abe, E., Nomura, K.H., Nomura, K., Ishibashi, Y., Okino, N., Hayashi, M., et al. (2017). Regulation of TG accumulation and lipid droplet morphology by the novel TLDP1 in *Aurantiochytrium limacinum* F26-b. *Journal of Lipid Research* 58, 2334-2347.
- Wase, N., Black, P., and DiRusso, C. (2018). Innovations in improving lipid production: Algal chemical genetics. *Progress in Lipid Research* 71, 101-123.
- Weiss, S.B., Kennedy, E.P., and Kiyasu, J.Y. (1960). The Enzymatic Synthesis of Triglycerides. *Journal of Biological Chemistry* 235, 40-44.
- Wen, Z.-Y., and Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances* 21, 273-294.
- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbüchel, A., and Mayer, F. (1995). Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology* 177, 2425-2435.
- Wilfling, F., Haas, J.T., Walther, T.C., and Farese, R.V. (2014). Lipid Droplet Biogenesis. *Current opinion in cell biology* 29, 39-45.
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J.T., Kraemer, N., Gould, T.J., Uchida, A., Cheng, J.-X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., et al. (2013). Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. *Developmental cell* 24, 384-399.
- Williams, S., and Martin, D. (2002). Applications of PHAs in medicine and pharmacy, Doi Y, Steinbüchel A (eds) Edition.
- Wilson, E. (1896). *The cell in development and inheritance*. Macmillan and N. York, eds.
- Wilson, I.D., Neill, S.J., and Hancock, J.T. (2007). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment* 31, 622-631.
- Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Tzekov, A., Croce, M.A., Gropler, M.C., Varma, V., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Kern, P.A., et al. (2006). OXPAT/PAT-1 Is a PPAR-Induced Lipid Droplet Protein That Promotes Fatty Acid Utilization. *Diabetes* 55, 3418.
- Wolman, M., Sterk, V.V., Gatt, S., and Frenkel, M. (1961). Primary familial xanthomatosis with involvement and calcification of the adrenals. Report of two more cases in siblings of a previously described infant. *Pediatrics* 25, 742-757.
- Wu, C.C., Howell, K.E., Neville, M.C., Yates, J.R., and McManaman, J.L. (2000). Proteomics reveal a link between the endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells. *ELECTROPHORESIS* 21, 3470-3482.
- Wu, D.H., Chen, A.D., and Johnson, C.S. (1995). An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 115, 260-264.
- X**
- Xie, W.-H., Pang, F., Niu, Y.-F., Zhang, M.-H., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Yan, D.-G., and Li, H.-Y. (2013). Functional characterization of an ACCase subunit from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 60, 330-335.
- Xu, C., and Shanklin, J. (2016). Triacylglycerol Metabolism, Function, and Accumulation in Plant Vegetative Tissues. *Annual Review of Plant Biology* 67, 179-206.
- Y**
- Yamaguchi, T., Fujikawa, N., Nimura, S., Tokuoka, Y., Tsuda, S., Aiuchi, T., Kato, R., Obama, T., and Itabe, H. (2015). Characterization of lipid droplets in steroidogenic MLTC-1 Leydig cells: Protein profiles and the morphological change

Références Bibliographiques

- induced by hormone stimulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1851**, 1285-1295.
- Yamaguchi, T., Matsushita, S., Motojima, K., Hirose, F., and Osumi, T. (2006). MLDP, a Novel PAT Family Protein Localized to Lipid Droplets and Enriched in the Heart, Is Regulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor α . *Journal of Biological Chemistry* **281**, 14232-14240.
- Yamasaki, H., and Sakihama, Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* **468**, 89-92.
- Yang, H.-J., Hsu, C.-L., Yang, J.-Y., and Yang, W.Y. (2012). Monodansylpentane as a Blue-Fluorescent Lipid-Droplet Marker for Multi-Color Live-Cell Imaging. *PLoS ONE* **7**, e32693.
- Yang, X., Lu, X., Lombès, M., Rha, G.B., Chi, Y.-I., Guerin, T.M., Smart, E.J., and Liu, J. (2010). The G(0)/G(1) Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase. *Cell metabolism* **11**, 194-205.
- Yao, S., Brandt, A., Egsgaard, H., and Gjermansen, C. (2012). Neutral lipid accumulation at elevated temperature in conditional mutants of two microalgae species. *Plant Physiol Biochem* **61**, 71-79.
- Yen, C.-L.E., Monetti, M., Burri, B.J., and Farese, R.V. (2005). The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters. *Journal of Lipid Research* **46**, 1502-1511.
- Yermanos, D.M. (1975). Composition of jojoba seed during development. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **52**, 115-117.
- Yoneda, K., Yoshida, M., Suzuki, I., and Watanabe, M.M. (2016). Identification of a Major Lipid Droplet Protein in a Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant and Cell Physiology* **57**, 397-406.
- Yoneda, K., Yoshida, M., Suzuki, I., and Watanabe, M.M. (2018). Homologous expression of lipid droplet protein-enhanced neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 30299-30304.
- Yoshimoto, K., Shibata, M., Kondo, M., Oikawa, K., Sato, M., Toyooka, K., Shirasu, K., Nishimura, M., and Ohsumi, Y. (2014). Organ-specific quality control of plant peroxisomes is mediated by autophagy. *Journal of Cell Science* **127**, 1161-1168.
- Youssef, A., Laizet, Y.h., Block, M.A., Maréchal, E., Alcaraz, J.-P., Larson, T.R., Pontier, D., Gaffé, J., and Kuntz, M. (2010). Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress. *The Plant Journal* **61**, 436-445.
- Yu, J., Zhang, S., Cui, L., Wang, W., Na, H., Zhu, X., Li, L., Xu, G., Yang, F., Christian, M., et al. (2015). Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1853**, 918-928.
- Yu, Y., Li, T., Wu, N., Jiang, L., Ji, X., and Huang, H. (2017). The Role of Lipid Droplets in *Mortierella alpina* Aging Revealed by Integrative Subcellular and Whole-Cell Proteome Analysis. *Scientific Reports* **7**, 43896.
- Yu, Y., Zhang, L., Li, T., Wu, N., Jiang, L., Ji, X., and Huang, H. (2018). How nitrogen sources influence *Mortierella alpina* aging: From the lipid droplet proteome to the whole-cell proteome and metabolome. *Journal of Proteomics* **179**, 140-149.
- ## Z
- Zabawinski, C., Van Den Koornhuysen, N., D'Hulst, C., Schlichting, R., Giersch, C., Delrue, B., Lacroix, J.-M., Preiss, J., and Ball, S. (2001). Starchless Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Lack the Small Subunit of a Heterotetrameric ADP-Glucose Pyrophosphorylase. *Journal of Bacteriology* **183**, 1069-1077.
- Zaslavskaja, L.A., Lippmeier, J.C., Kroth, P.G., Grossman, A.R., and Apt, K.E. (2000). Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *Journal of Phycology* **36**, 379-386.
- Zehr, J.P., and Ward, B.B. (2002). Nitrogen Cycling in the Ocean: New Perspectives on Processes and Paradigms. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1015-1024.
- Zhang, C., and Hu, H. (2014). High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation. *Marine Genomics* **16**, 63-66.
- Zhang, C., and Liu, P. (2017). The lipid droplet: A conserved cellular organelle. *Protein & Cell* **8**, 796-800.
- Zhang, C., Yang, L., Ding, Y., Wang, Y., Lan, L., Ma, Q., Chi, X., Wei, P., Zhao, Y., Steinbüchel, A., et al. (2017). Bacterial lipid droplets bind to DNA via an intermediary protein that enhances survival under stress. *Nature Communications* **8**, 15979.

Références Bibliographiques

- Zhang, H., Wang, Y., Li, J., Yu, J., Pu, J., Li, L., Zhang, H., Zhang, S., Peng, G., Yang, F., et al. (2011). Proteome of Skeletal Muscle Lipid Droplet Reveals Association with Mitochondria and Apolipoprotein A-I. *Journal of Proteome Research* 10, 4757-4768.
- Zhang, J., Zhang, Z., Chukkappalli, V., Nchoutmboube, J.A., Li, J., Randall, G., Belov, G.A., and Wang, X. (2016). Positive-strand RNA viruses stimulate host phosphatidylcholine synthesis at viral replication sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E1064-E1073.
- Zhang, P., Na, H., Liu, Z., Zhang, S., Xue, P., Chen, Y., Pu, J., Peng, G., Huang, X., Yang, F., et al. (2012). Proteomic Study and Marker Protein Identification of *Caenorhabditis elegans* Lipid Droplets. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 11, 317-328.
- Zhao, X., Lasell, T.K.R., and Melançon, P. (2002). Localization of Large ADP-Ribosylation Factor-Guanine Nucleotide Exchange Factors to Different Golgi Compartments: Evidence for Distinct Functions in Protein Traffic. *Molecular Biology of the Cell* 13, 119-133.
- Zhang, Z., Xing, L., Wu, Z., Liu, C., Lin, C., and Liu, L. (2006). Discovery of nitric oxide in marine ecological system and the chemical characteristics of nitric oxide. *Science in China Series B: Chemistry* 49, 475-480.
- Zhi, Y., Taylor, M.C., Campbell, P.M., Warden, A.C., Shrestha, P., El Tahchy, A., Rolland, V., Vanhercke, T., Petrie, J.R., White, R.G., et al. (2017). Comparative Lipidomics and Proteomics of Lipid Droplets in the Mesocarp and Seed Tissues of Chinese Tallow (*Triadica sebifera*). *Frontiers in Plant Science* 8, 1339.
- Zhu, Z., Ding, Y., Gong, Z., Yang, L., Zhang, S., Zhang, C., Lin, X., Shen, H., Zou, H., Xie, Z., et al. (2015). Dynamics of the Lipid Droplet Proteome of the Oleaginous Yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Eukaryotic Cell* 14, 252-264.
- Zienkiewicz, K., Du, Z.-Y., Ma, W., Vollheyde, K., and Benning, C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 1269-1281.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., et al. (2004). Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science* 306, 1383-1386.
- Zolman, B.K., Silva, I.D., and Bartel, B. (2001). The Arabidopsis pxa1 Mutant Is Defective in an ATP-Binding Cassette Transporter-Like Protein Required for Peroxisomal Fatty Acid β -Oxidation. *Plant Physiology* 127, 1266-1278.
- Zulu, N.N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., and Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research* 70, 1-16.

Liste des productions scientifiques

Articles dans revue à comité de lecture :

1. **Lupette, J.**, Lami, R., Krasovec, M., Grimsley, N., Piganeau, G., Moreau, H., Sanchez-Ferandin, S. 2016. *Marinobacter* dominates the bacterial community of the *Ostreococcus tauri* phycosphere in culture. **Frontiers in Microbiology**. 7:1414.
2. Dolch*, L.J., **Lupette***, J., Tourcier, G., Bedhomme, M., Collin, S., Magneschi, L., Conte, M., Seddiki, K., Richard, C., Corre, E., Fourage, L., Laeuffer, F., Richards, R., Reith, M., Rébeillé, F., Jouhet, J., McGuinn, P., Maréchal, E. 2017. Nitric oxide mediates nitrite-sensing and adaptation and triggers a remodeling of glycerolipids in *Phaeodactylum*. **Plant Physiology**. 175(3):1407-1423. *: contribution égale
3. Jouhet, J., **Lupette, J.**, Clerc, O., Magneschi, L., Bedhomme, M., Collin, S., Roy, S., Maréchal, E., Rébeillé, F. 2017. LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. **PLoS One**. 12(8):e0182423.
4. Conte, M., **Lupette, J.**, Seddiki, K., Meï, C., Dolch, L.J., Gros, V., Barette, C., Rébeillé, F., Jouhet, J., Maréchal, E. 2018. Screening of biologically annotated drugs triggering triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum*. **Plant Physiology**. 177:532-552.
5. Dellerio, Y., Rose, S., Metton, C., Morabito, C., **Lupette, J.**, Jouhet, J., Rébeillé, F., Maréchal, E., Amato, A. Autoecology and ecophysiology of a eukaryotic marine scavenger. **Environmental microbiology**. 20(8):3057-3068.
6. Dellerio, Y., Cagnac, O., Rose, S., Seddiki, K., Cussac, M., Morabito, C., **Lupette, J.**, Cigliano R.A., Sanseverino, W., Kuntz, M., Jouhet, J., Maréchal, E., Rébeillé, F., Amato, A. Proposal of a new thraustochytrid genus *Hondaea* gen. nov. and comparison of its lipid dynamics with the closely related pseudo-cryptic genus *Aurantiochytrium*. **Algal Research**. 35:125-141.
7. **Lupette, J.**, Jaussaud, A., Vigor, C., Oger, C., Galano, J.M., Reversat, G., Vercauteren, J., Jouhet, J., Durand, T., Maréchal, E. 2018. Non-enzymatic synthesis of bioactive isoprostanoïds in the diatom *Phaeodactylum* following oxidative stress. **Plant Physiology**. 178:1344-1357.
8. **Lupette, J.**, Jaussaud, A., Seddiki, K., Morabito, C., Brugière, S., Schaller, H., Kuntz, M., Putaux, J.L., Jouneau, P.H., Rébeillé, F., Falconet, D., Coute, Y., Jouhet, J., Tardif, M., Salvaing, J., Maréchal, E. 2019. The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Algal Research**. 38: 101415.
9. Decelle, J., Stryhanyuk, H., Gallet, B., Veronesi, G., Schmidt, M., Balzano, S., Marro, S., , Uwizeye, C., Jouneau, P.H., **Lupette, J.**, Jouhet, J., Maréchal, E., Schwab, Y., Schieber, N., Tucoulou, R., Richnow, H., Finazzi, G., Musat, N. 2019. Algal remodeling in a ubiquitous planktonic photosymbiosis. **Current Biology**. In press.

Chapitres d'ouvrage :

1. **Lupette, J.**, Maréchal, E. 2018. Chapter 6. Phytoplankton glycerolipids, challenging but promising prospects from biomedicine to green chemistry and biofuels, in **Blue Technologies: Production and Use of Marine Molecules**, by Stéphane La Barre and Stephen S. Bates (Eds). Wiley VCH. 191-215.

2. Gros, V., **Lupette J.**, Jouhet, J. 2018. Extraction and quantification of lipids from plant or algae, in ***Plastids – Methods and Protocols***, by Eric Maréchal (Eds). Humana Press, New York, USA. 1829: 213-240.

3. **Lupette J.**, Maréchal E. 2018. Chapitre 13 - Potentiel des microalgues pour la chimie verte et les bioénergies, in ***Microbiodiversité, Un nouveau regard***, by Laurent Palka (Eds). Matériologiques. 321-338.

Article soumis :

Balzano, S., Villanueva, L., de Bar, M., Sahonevo-Canavesi, D., Yildiz, C., Engelmann, J., Maréchal, E., **Lupette, J.**, Sinninghe Damsté, J., Schouten, S. Biosynthesis of long chain alkyl diols and long chain alkenols in *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatophyceae). ***Plant and Cell Physiology***. *Soumis*.

Articles en préparation:

1. Maréchal, E., **Lupette, J.** Interplay between fatty acid and sterol metabolism in Diatoms. ***Biochimie***. *In preparation*.

2. Pinto, J., Lami, R., **Lupette, J.**, Grimsley, N., Piganeau, G., Sanchez-Brosseau, S. The marine opportunistic bacteria *Marinobacter algicola* found in phytoplanktonic cultures does not promote the growth of the microalga *Ostreococcus tauri* in culture but instead benefits from it. *In preparation*.

Liste de participation à des conférences

Communication sous forme de poster

Lupette, J., Leclère L., Sinigaglia, C., Houliston, E. Étude de la regeneration chez la medusa *Clytia hemisphaerica*. Journée des posters M1 BI, Université Pierre et Marie Curie. 30th June 2014, **Paris (France)**.

Lupette, J., Sanchez-Ferandin, S. Microalgae-bacteria interaction in the picoeukaryote photosynthetic model *Ostreococcus tauri* RCC4221. 6^{èmes} journée André Picard, Observatoire Océanologique, 29-30 April 2015. **Villefranche sur Mer (France)**.

Lupette J., Morabito, C., Salvaing, J., Rébeillé, F., Gromova, M., Jaillais, Y., Maréchal, E. Development, Architecture and Dynamics of microalgae lipid droplets. 16^{ème} journée scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides. Institut Idée, 26th May 2016, **Lyon (France)**.

Lamotte, H., Roux, J.M., **Lupette, J.**, Maréchal, E., Achard, J.L. A new shockwaves based technique for cell lysis. GDR Micro et NanoFluidique 2016. Institut Pierre Gilles de Gennes. 23-24 June 2016, **Paris (France)**.

Lupette J., Morabito, C., Salvaing, J., Rébeillé, F., Gromova, M., Jaillais, Y., Maréchal, E. Development, Architecture and Dynamics of microalgae lipid droplets. 22nd International Symposium on Plant Lipids. Alte Mensa, 03-08 July 2016, **Göttingen (Germany)**.

Lamotte, H., Roux, J.M., Lupette, J., Maréchal, E., Achard, J.L. Extraction by spark generated shockwaved. AlgaeEurope. 13-15 December 2016, **Madrid (Spain)**.

Lupette, J., Conte, MM, Dolch, L.J., Oger, C., Galano, J.M., Vercauteren, J., Reversat, G., Vigor, C., Durand, T., Jouhet, J., Salvaing, J., Maréchal, E. Lipid-derived infochemicals in *Phaeodactylum*. Gordon Research Seminar & Gordon Research Conference – Plant Lipids: Structure, Metabolism & Function. Hotel Galvez, 28 January – 03 February 2017. **Galveston (USA)**.

Dellero, Y., **Lupette, J.**, Leterrier, M., Morabito, C., Amato, A., Rose, S., Cussac, M., Rébeillé, F., Maréchal, E. Deciphering the role of CGI-58/ABDH5 in the model marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Jacques Monod Conferences. 03-07 April 2017, **Roscoff (France)**.

Salvaing, J., **Lupette, J.**, Dolch, L.J., Amato, A., Falconet, D., Rébeillé, F., Jouhet, J., Maréchal, E. Chloroplasts with four membranes: what consequences for the homeostasis of lipid in model microalgae? Jacques Monod Conferences. 03-07 April 2017, **Roscoff (France)**..

Lupette, J., Conte, MM, Dolch, L.J., Oger, C., Galano, J.M., Vercauteren, J., Reversat, G., Vigor, C., Durand, T., Jouhet, J., Salvaing, J., Maréchal, E. Lipid-derived infochemicals in *Phaeodactylum*. 17^{ème} journée scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides. Salle de séminaire du CNRS, 3rd May 2017, Grenoble (France).

Dellero, Y., **Lupette, J.**, Leterrier, M., Morabito, C., Amato, A., Rose, S., Cussac, M., Rébeillé, F., Maréchal, E. Deciphering the role of CGI-58/ABDH5 in the model marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. 17^{ème} journée scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides. Salle de séminaire du CNRS, 3rd May 2017, Grenoble (France).

Salvaing, J., **Lupette, J.**, Dolch, L.J., Amato, A., Falconet, D., Rébeillé, F., Jouhet, J., Maréchal, E. Chloroplasts with four membranes: what consequences for the homeostasis of lipid in model microalgae? 17^{ème} journée scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides. Salle de séminaire du CNRS, 3rd May 2017, Grenoble (France).

Gromova, M., Guillermo, A., Bayle, P.A., **Lupette, J.**, Jaussaud, A., Maréchal, E., Bardet, M. Mesures de la taille des corps lipidiques par RMN diffusionnelle. 17ème journée scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides. Salle de séminaire du CNRS, 3rd May 2017, **Grenoble (France)**.

Lupette, J., Conte, M.M., Dolch, L.J., Oger, C., Galano, J.M., Vercauteren, J., Reversat, G., Vigor, C., Durand, T., Jouhet, J., Salvaing, J., Maréchal, E. Lipid-derived infochemicals in *Phaeodactylum*. Journée scientifique BIG, Minatec, 7th November 2017, **Grenoble (France)**.

Jaussaud, A., **Lupette, J.**, Gromova, M., Guillermo, A., Bayle, P.A., Maréchal, E., Bardet, M. Live determination of triacylglycerols quantity and lipid droplets size in the microalgae *P.tricornutum* using NMR-based methods. 18ème journée scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides, Amphithéâtre Volcan, Faculté de Médecine, **Clermont Ferrand (France)**.

Lupette, J., Jaussaud, A., Gromova, M., Brugière, S., Couté, Y., Tardif, M., Kuntz, M., Falconet, D., Salvaing, J., Rébeillé, F., Jouhet, J., Maréchal, E., Development, Architecture & Dynamics of lipid droplets in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Amphithéâtre Volcan, Faculté de Médecine, **Clermont Ferrand (France)**.

Lebon, A., **Lupette, J.**, Jouhet, J., Maréchal, E., Salvaing, J. Seipin overexpression leads to accelerated accumulation of lipid droplets in *Phaeodactylum tricornutum*. 14th GERLI lipidomics Meeting. Hôtel Le Couvent Royal, 30th September – 3rd October 2018, **St Maximin la Saint-Baume (France)**.

Communication sous forme de presentation orale (*: orateur)

Lupette*, J., Jaussaud, A., Gromova, M., Brugière, S., Couté, Y., Tardif, M., Kuntz, M., Falconet, D., Salvaing, J., Rébeillé, F., Jouhet, J., Maréchal, E., Development, Architecture & Dynamics of lipid droplets in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. 23th International Symposium on Plant Lipids. Osanbashi Hall, 8-13th July 2018, **Yokohama (Japan)**.

Rébeillé*, F., Amato, A., Dellerio, Y., Rose, S., **Lupette, J.**, Jouhet, J., Maréchal, E., Lipid dynamics and ecophysiology of a marine protest (*Aurantiochytrium limacinum*) involved in mangrove leaf decomposition. 23th International Symposium on Plant Lipids. Osanbashi Hall, 8-13th July 2018, **Yokohama (Japan)**.

Conte, M., **Lupette, J.**, Seddiki, K., Meï, C., Dolch, L.J., Gros, V., Barette, C., Rébeillé, F., Jouhet, J., Maréchal*, E. 23th International Symposium on Plant Lipids. Osanbashi Hall, 8-13th July 2018, **Yokohama (Japan)**.

Lupette*, J., Jaussaud, A., Gromova, M., Brugière, S., Couté, Y., Tardif, M., Kuntz, M., Falconet, D., Salvaing, J., Rébeillé, F., Jouhet, J., Maréchal, E., Development, Architecture & Dynamics of lipid droplets in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. 14th GERLI lipidomics Meeting. Hôtel Le Couvent Royal, 30th September – 3rd October 2018, **St Maximin la Saint-Baume (France)**.

Développement, Architecture et Dynamique des gouttelettes lipidiques de la diatomée pennée *Phaeodactylum tricornutum*.

De par leur qualité d'accumulation de triacylglycérol (TAG) sous forme de gouttelettes lipidiques (LDs) lors de stress abiotiques, les microalgues oléagineuses se sont imposées comme des modèles d'études d'intérêt pour de nombreuses applications biotechnologiques (nutrition, chimie verte, biocarburants, santé humaine). Ces stress sont cependant responsables d'un arrêt de la croissance et de production de biomasse. Un criblage de petites molécules visant à favoriser l'accumulation de TAG chez la diatomée *Phaeodactylum* a mis en lumière 34 composés connus pour agir sur certaines voies métaboliques de signalisation. Une étude approfondie des effets du 17 α -éthynylestradiol est proposée. La mise en lumière de composés ciblant les nucléotides cycliques et les oxylipines nous a conduit à réévaluer les effets du monoxyde d'azote (NO \cdot) et à détecter la présence d'isoprostanoïdes après un stress oxydant chez *Phaeodactylum*.

Les LDs sont des structures conservées, des procaryotes jusqu'aux endosymbiontes secondaires, présentant un cœur hydrophobe entouré d'une monocouche de lipides polaires dans laquelle s'enchaînent des protéines de façon transitoire ou permanente. Ces protéines peuvent jouer un rôle structural ou être impliquées dans la biologie de la gouttelette. Après optimisation d'un protocole de purification, nous avons déterminé le glycérolipidome et le protéome de la LD de *Phaeodactylum*. Le cœur hydrophobe des LDs est constitué uniquement de TAG entouré d'une monocouche de lipides polaires composée de phosphatidylcholine (PC), sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et de deux espèces moléculaires (20:5-16:1 et 20:5-16:2) de DGTA, un bétaine lipide. Un stérol libre localisé probablement dans la monocouche, le brassicastérol, a été également détecté. Un enrichissement spécifique en β -carotène a été observé. Le protéome de la LD est composé de 86 protéines incluant notamment la LD-protéine StLDP, des acteurs du métabolisme, des protéines associées à des organites membranaires, au traitement de l'information génétique ou encore des chaperonnes impliquées dans le contrôle qualité des protéines. Ces travaux nous éclairent sur la biogenèse et la découverte de possibles nouvelles fonctionnalités de la LD de *Phaeodactylum*. Nous proposons un nouveau modèle architectural pour la LD nous interrogeant sur ses origines. Des perspectives d'études, pour la caractérisation fonctionnelle des acteurs protéiques de la LD et sur une relocalisation de la LD vers la membrane plasmique pour favoriser son extraction, sont proposées.

Mots clés : *Phaeodactylum*, gouttelettes lipidiques, architecture, protéome, petites molécules, TAG

Development, Architecture and Dynamics of lipid droplets in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*

Due to their quality of triacylglycerol (TAG) content in the form of lipid droplets (LDs) accumulating upon abiotic stresses, microalgae have emerged as models of interest for many biotechnological applications (nutrition, green chemistry, biofuels, human health). These stresses, however, are responsible for a growth arrest and low biomass yield. A phenotypic screen of small molecules triggering TAG accumulation in *Phaeodactylum* highlighted 34 compounds known to act on specific metabolic and signaling pathways. A detailed study of the effects of 17 α -ethynylestradiol is proposed. The identification of compounds interfering with cyclic nucleotides and oxylipins led us to re-evaluate the effects of nitric oxide (NO \cdot) and to characterize the activity of isoprostanoïds after oxidative stress in the diatom *Phaeodactylum*.

LDs are subcellular structures, conserved from prokaryotes to secondary endosymbionts, containing a hydrophobic core surrounded by a monolayer of polar lipids to which proteins transiently or permanently associate. These proteins may play a structural role or be involved in the function of the droplet. After optimization of a purification protocol, we determined the glycerolipidome and the proteome of the LD of *Phaeodactylum*. The hydrophobic core is only made of TAG surrounded by a monolayer of polar lipids consisting of phosphatidylcholine (PC), sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and two molecular species (20:5-16:1 and 20:5-16:2) of DGTA, a betaine lipid. A sterol probably located in the monolayer, brassicasterol, was also detected. Specific enrichment of β -carotene has been observed. The proteome of the LD is composed of 86 proteins including most notably the LD-protein StLDP, metabolic actors, organelle membrane associated proteins, proteins implicated in the treatment of genetic information or chaperones involved in protein quality control. This thesis allows us a better understanding of the biogenesis and the discovery of possible new functionalities of the *Phaeodactylum* LD. We propose an architectural model for the LD, and address the question of its origins. Future prospects on the functional characterization of LD proteins and relocation of LD to the plasma membrane to promote its extraction are proposed.

Keywords: *Phaeodactylum*, lipid droplets, architecture, proteome, small molecules, TAG

CEA Grenoble

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale – UMR 5168 CEA / CNRS / Université
Grenoble Alpes – UMR 1417 INRA

17, avenue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 9