



HAL
open science

Biosynthèse des galactolipides de plantes : étude structurale et fonctionnelle de la MGDG synthase 1 (MGD1) d'*Arabidopsis thaliana*

Milène Nitenberg

► **To cite this version:**

Milène Nitenberg. Biosynthèse des galactolipides de plantes : étude structurale et fonctionnelle de la MGDG synthase 1 (MGD1) d'*Arabidopsis thaliana*. Cristallographie. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV042 . tel-02927781

HAL Id: tel-02927781

<https://theses.hal.science/tel-02927781v1>

Submitted on 2 Sep 2020

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 : Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Milène NITENBERG

Thèse dirigée par **Christelle BRETON**,
et codirigée par **Maryse BLOCK** et **Agnès GIRARD-EGROT**

préparée au sein du **Laboratoire CE**ntre de Recherche sur les **MA**cromolécules
Végétales
dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

Biosynthèse des galactolipides de plantes : étude structurale et fonctionnelle de la MGDG synthase 1 (MGD1) d'*Arabidopsis thaliana*

Thèse soutenue publiquement le **26 novembre 2018**,
devant le jury composé de :

Madame VERONIQUE VIE

MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE DE RENNES 1, Rapporteur

Madame YONGHUA LI-BEISSON

INGENIEUR-CHERCHEUR, CEA, CADARACHE, Rapporteur

Madame MURIEL BARDOR

PROFESSEUR, UNIVERSITE DE ROUEN, Examineur

Madame CECILE BREYTON

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS, GRENOBLE, Examineur

Monsieur FRANCK FIESCHI

PROFESSEUR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Président



REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de thèse Christelle Breton, ainsi que mes co-directrices Maryse Block et Agnès Girard-Egrot de m'avoir donné l'opportunité de mener à bien ce sujet de thèse.

Je souhaite, en particulier, exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde admiration à Agnès qui a été la première personne à me faire confiance et qui m'a transmis cette passion de la recherche lors de mon stage de M1. Elle m'a initiée aux monocouches de Langmuir en m'apportant toutes les connaissances théoriques et pratiques. Elle est surtout la personne qui a su me donner confiance en moi et qui m'aura portée durant ces 5 dernières années. Je n'oublierais jamais nos conversations qui m'ont enrichies tant scientifiquement que personnellement.

Je remercie chaleureusement Anne Imberty, Eric Maréchal et Loïc Blum pour leur accueil au sein de leur laboratoire.

J'adresse mes remerciements les plus sincères aux examinateurs (Muriel Bardor et Cécile Breyton), aux rapporteurs (Véronique Vié, Yonghua Li-Beisson) et au président (Franck Fieschi) pour avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci à Juliette Jouhet pour sa contribution au projet et Catherine Albrieux pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je n'oublierais jamais les moments que j'ai pu passer avec Meriem et Julie ; merci d'avoir toujours été présentes, vous avez été mes rocs lors de ces dernières années.

Je remercie également Agnès D., Béa, Fred et Ofelia pour leur gentillesse et leur affection qui créent une ambiance unique au sein du laboratoire. Je remercie Bastien pour sa grande disponibilité.

Je remercie Joao, Mickael, Mathilde, Charlène et Arnaud pour tous les agréables moments que l'on a pu partager.

Je tiens à remercier Valou sans qui ma thèse n'aurait pas été la même. Merci pour ton dynamisme, ta grande sympathie et ta disponibilité.

Enfin, un grand merci à tous les membres de mes différentes équipes pour votre accueil et votre partage. J'ai eu la chance de rencontrer des personnes formidables tout au long de ces années.

Un clin d'œil à Pierrick, une rencontre au hasard qui a conduit à une très belle amitié.

Merci à ma meilleure amie, Astrid, d'être cette femme incroyable sur qui j'ai toujours pu compter.

J'adresse toute mon affection à ma famille, et plus particulièrement, je tiens à remercier mon frère de toujours veiller sur moi. Merci à ma sœur Lauriane qui m'a accompagnée tout le long de mon écriture, ce qui la rendu vraiment agréable. Merci à ma Maman, une femme extraordinaire, qui a fait de moi celle que je suis devenue aujourd'hui et merci pour cette mémorable soirée que tu m'as offerte. Une énorme pensée pour ma Mamie qui j'espère a pu me voir grandir de là où elle est.

Enfin, je remercie mon fiancé qui a toujours su m'épauler, m'écouter et me supporter durant ces trois années ! Tu as été présent à chaque instant, pour que je puisse mener à bien ce projet.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION.....	13
I. Les galactolipides	16
1) Définition	16
2) Structure	16
3) Biosynthèse des glycérolipides chez la plante.....	17
a) <i>Synthèse des acides gras</i>	18
b) <i>Formation des glycérolipides majeurs</i>	20
c) <i>Trafic des galactolipides après leur synthèse</i>	28
4) Rôles des galactolipides.....	30
a) <i>Rôle structural dans l'architecture des thylakoïdes</i>	30
b) <i>Rôle dans le cas de carence en phosphate</i>	32
c) <i>Rôle dans la photosynthèse</i>	33
d) <i>Rôle dans la biogenèse des thylakoïdes</i>	35
II. Les glycosyltransférases (GTs)	36
1) Définition	36
2) Classification des GTs	37
3) Structures et mécanismes réactionnels	38
a) <i>Structures</i>	38
b) <i>Mécanismes réactionnels</i>	39
III. Les monogalactosyldiacylglycérol synthases (MGDG synthases).....	41
1) Phylogénie	41
2) Les MGDG synthases de <i>Arabidopsis thaliana</i> (MGD1, MGD2, MGD3)....	43
3) La MGD1 (Etat de l'art).....	45
a) <i>Fonction</i>	45

b) Localisation.....	45
c) Structure.....	46
d) Mécanisme réactionnel	47
e) Propriétés de liaison à la membrane	48
f) Rôle des lipides anioniques.....	49
Objectifs du travail de thèse.....	51
MATERIELS ET METHODES.....	53
I. Expression des protéines recombinantes chez <i>Escherichia Coli</i>.....	54
1) Préparation des souches d'expression	54
a) Construction de l'ADN modifié.....	54
b) Incorporation de l'ADN modifié dans les bactéries compétentes XL1	54
c) Extraction de l'ADN plasmidique.....	55
d) Expression de la protéine sous forme recombinante dans la souche BL21 (DE3) d'E.Coli.....	55
2) Expression des protéines recombinantes (atMGD1 Δ 137, H155A, P189A, W287A, CaMGD1) chez <i>E. Coli</i>	55
II. Purification des protéines recombinantes	56
1) Préparation des extraits cellulaires	56
2) Purification des protéines recombinantes	56
III. Méthodes d'analyse des protéines	57
1) Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	57
2) Diffusion dynamique de la lumière	58
3) Mesure de l'activité enzymatique des protéines recombinantes.....	58
a) Tests d'activité par radioactivité	58
b) Mesure d'activité par bioluminescence	60
IV. Cristallisation des protéines	62

V.	Interactions membranaires	63
1)	Monocouches de Langmuir	63
	a) <i>Formation des monocouches de Langmuir</i>	63
	b) <i>Pression de surface</i>	63
	c) <i>Isothermes de compression : $\pi = f(A)$</i>	66
	d) <i>Protocole</i>	68
2)	Etude de l'interaction protéine-monocouche.....	69
	a) <i>Détermination de la constante de vitesse d'association (k)</i>	69
	b) <i>Détermination de la pression maximale d'insertion, de la synergie d'interaction et du différentiel $d\pi_0$</i>	70
	c) <i>Protocole</i>	73
3)	Technique du transfert Langmuir-Blodgett.....	73
4)	Microscopie à force atomique (AFM).....	74
5)	Tests d'activité en monocouche.....	75
VI.	Extraction lipidique selon la méthode de Bligh et Dyer.....	76
VII.	Spectrométrie de masse.....	77
RESULTATS	79	
	CHAPITRE I : Etude structurale et fonctionnelle de la monogalactosyldiacylglycérol synthase 1 d'<i>Arabidopsis thaliana</i> : MGD1.....	81
I.	Expression de MGD1 et des mutants	82
II.	Purification de MGD1 et des mutants.....	84
III.	Etude cristallographique de MGD1	88
	1) Essais précédents.....	88
	2) Mes résultats	89
IV.	Tests d'activité de MGD1 et des mutants avec effecteurs	90
V.	Développement d'un test d'activité de MGD1 par bioluminescence	92

CHAPITRE II : Etudes des propriétés d'association membranaire de MGD1 et de ses mutants par la technique des monocouches de Langmuir	97
I. Mise au point du protocole expérimental.....	97
1) Conditions d'expériences en monocouches.....	97
2) Isothermes du PG, du DAG ou du mélange DAG-PG (1 :3 mol/mol).....	99
3) Etude de la stabilité des monocouches.....	100
II. Résumé de l'article.....	101
III. Publication.....	103
IV. Résultats complémentaires non publiés	129
CHAPITRE III : Développement d'un nouveau test d'activité de la MGD1 en monocouche	133
I. Introduction à l'article.....	133
II. Publication.....	136
III. Problèmes rencontrés pour la quantification des lipides par SM	155
CHAPITRE IV : Résultats préliminaires de l'étude de MGD1 de <i>Caldilinea aerophila</i> (CaMGD1).....	157
I. Expression et purification de CaMGD1	157
II. Tests d'activité en radioactivité de CaMGD1 avec effecteurs	159
CONCLUSION GENERALE	161
ANNEXES.....	167
I. Mini Review: Do galactolipid synthases play a key role in the biogenesis of chloroplast membranes of higher plants?.....	168
II. Posters et Communications orales	176
1) Posters	176
2) Communications orales	176
III. Tableaux des transitions et chromatogrammes	178
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	179

ABBREVIATIONS

Produits chimiques

ATP : Adénosine TriPhosphate

CDP-DAG : Cytidine DiPhosphate-DiAcylGlycérol

CHAPS : 3-CHolAmidopropyl diméthylammonio-1-PropaneSulfonate

DTT : DiThioThréitol

Gal : Galactose

G3P : Glycérol-3-Phosphate

IPTG : IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside

K_M : Kanamycine

LB : *Lysogeny Broth*

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

TCEP : Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine

UDP : Uridine DiPhosphate

UDP-Gal : Uridine DiPhosphate Galactose

Enzymes

ACC_{ase} : Acétyl-CoA Carboxylase

ACT : ACylTransférerase

ACS : Acyl-CoA Synthase

CDS : CDP-Diacylglycérol Synthase

FAS : *Fatty Acid Synthase*

FAD : *Fatty Acid Desaturase*

GT : GlycosylTransférerase

GPAT : Glycérol-3-Phosphate AcylTransférerase

KAS : β -KetoAcyl Synthase

MAT : ACP MAlonylTransférerase

MGD1 : MonoGalactosylDiacylglycérol synthase 1

PAP : PhosphAtidate Phosphatase

PGP : PhosphatidylGlycérol-Phosphate synthase

PGP-P : PhosphatidylGlycérol-Phosphate Phosphatase

PGP1 : PhosphatidylGlycérol-Phosphate synthase 1

PSI et PSII : PhotoSystèmes I et II

Lipides

AG : Acide Gras

AP (ou PA en anglais) : Acide Phosphatidique

DAG : DiAcylGlycérol

DGDG : DiGalactosylDiacylGlycérol

LPA : LysoPhosphAtidate

MGDG : MonoGalactosylDiacylGlycérol

PC : PhosphatidylCholine

PE : PhosphatidylEthanolamine

PG : PhosphatidylGlycérol

SQDG : SulfoQuinovosylDiacylGlycérol

Grandeurs

α : synergie d'interaction

DO : Densité Optique

mAu : milli unités d'absorbance

MIP : *Maximal Insertion Pressure* (Pression maximale d'insertion)

P_i : Phosphate inorganique

rpm : rotation par minutes

sn : *stereospecific number*

τ : taux de transfert

Π : pression de surface

Π_e : pression de surface d'équilibre

Π_i : pression de surface initiale

Appareillages et techniques

AFM : *Atomic Force Microscopy* (microscopie à force atomique)

DLS : *Dynamic Light Scattering* (diffusion dynamique de la lumière)

ESI : *Electrospray Source Ionization* (source d'ionisation à électrospray)

ABREVIATIONS

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography* (chromatographie liquide à haute performance)

IMAC : *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés)

LB : Langmuir-Blodgett

LC-MS / MS : *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse)

SM : Spectrométrie de Masse

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SDS-PAGE : *Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium)

SEC : *Size-Exclusion Chromatography* (chromatographie d'exclusion stérique)

Autres

ABD : *Acceptor Binding Domain*

ACP : *Acyl Carrier Protein*

ATS : glycérol-3-phosphate AcylTransférase

CAZy : *Carbohydrate Active enZyme database*

CI : Corps d'Inclusion

Ctp : *Chloroplastic transit peptide*

IEM : *Inner Envelope Membrane*

KO : *Knock-Out*

LC : Liquide Condensé

LHCII : *Light Harvesting Complex II* (Complexe collecteur de lumière II)

LE : Liquide Expansé

NBD : *Nucleotide Binding Domain*

OEM : *Outer Envelope Membrane*

RE : Réticulum Endoplasmique

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les cellules végétales sont entourées par une paroi cellulaire, spécifique du végétal, qui est l'enveloppe la plus externe. Cette paroi assure le maintien et définit la taille et la forme de la cellule végétale. Elle participe à la régulation des relations avec les autres cellules et avec l'extérieur, et, de manière passive, au transport, à l'absorption, et à la sécrétion de multiples substances. Les cellules végétales sont délimitées par une membrane plasmique. Elles comportent différents compartiments subcellulaires composés, d'une part, du *système endomembranaire* (le réticulum endoplasmique (RE), l'enveloppe nucléaire, l'appareil de Golgi, la vacuole) relié par un intense réseau de tubules membranaires et de trafics vésiculaires et, d'autre part, des *organites semi-autonomes* comprenant les mitochondries communes aux eucaryotes et les plastes spécifiques des végétaux (Figure 1).

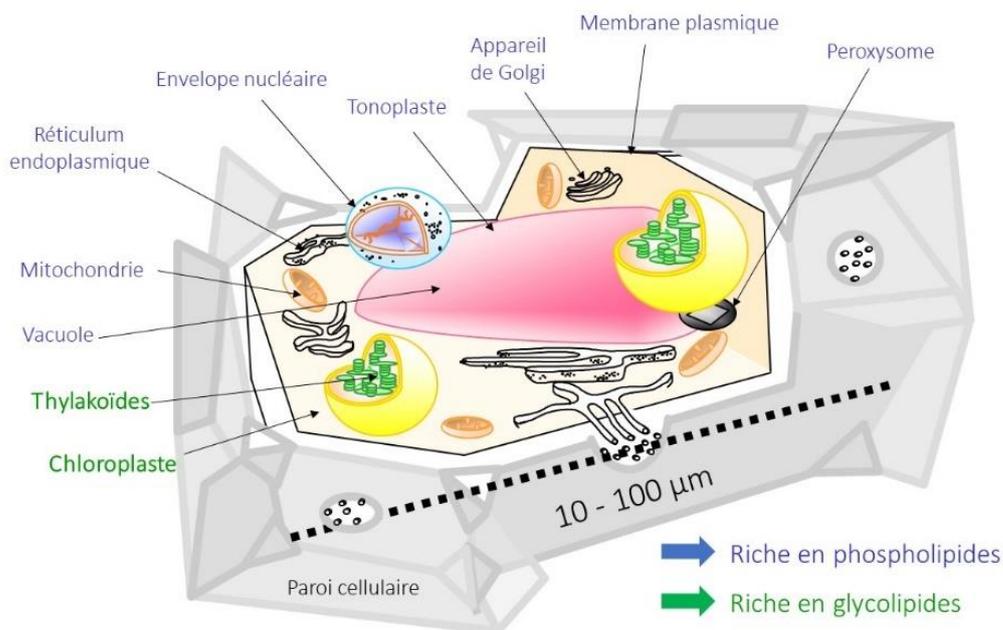


Figure 1 : Compartimentation d'une cellule végétale. Schéma d'une cellule végétale avec ses différents organites. (Figure provenant de Éric Maréchal)

Le chloroplaste est le siège de la photosynthèse. Chez les plantes supérieures, il est entouré d'une enveloppe composée d'une membrane externe (OEM : *Outer Envelope Membrane*) et d'une membrane interne (IEM : *Inner Envelope Membrane*). L'épaisseur de chacune des membranes de l'enveloppe est de l'ordre de 4 à 5 nm. L'espace intermembranaire représente une distance de 10-20 nm (Graham Shipley *et al.*, 1973). Les membranes photosynthétiques, encore appelées thylakoïdes, constituent un réseau membranaire très développé à l'intérieur des chloroplastes (Gounaris & Barber, 1983) (Figure

2). Les complexes multiprotéiques responsables de la photosynthèse sont insérés dans ces thylakoïdes. Ils permettent la capture de l'énergie lumineuse et sa transformation en énergie chimique par les processus moléculaires initiaux de la photosynthèse oxygénée (séparation de l'eau et production d'oxygène, transferts d'électrons, établissement d'un gradient de protons transmembranaires et de la force proton-motrice, synthèse de l'ATP). Les thylakoïdes comportent différentes structures qui contribuent de manière différentielle au processus de photosynthèse et à sa régulation. On distingue des empilements de citernes membranaires aplaties, nommés « *grana* », composés de 5 à 20 couches de membranes et un réseau membranaire intergranaire de « *lamellae* » non empilées (Pribil *et al.*, 2014). Dans leur ensemble, les thylakoïdes des différents organismes photosynthétiques telles que les cyanobactéries, les algues et les plantes supérieures, représentent le système de membranes biologiques le plus abondant sur terre (Gounaris & Barber, 1983).

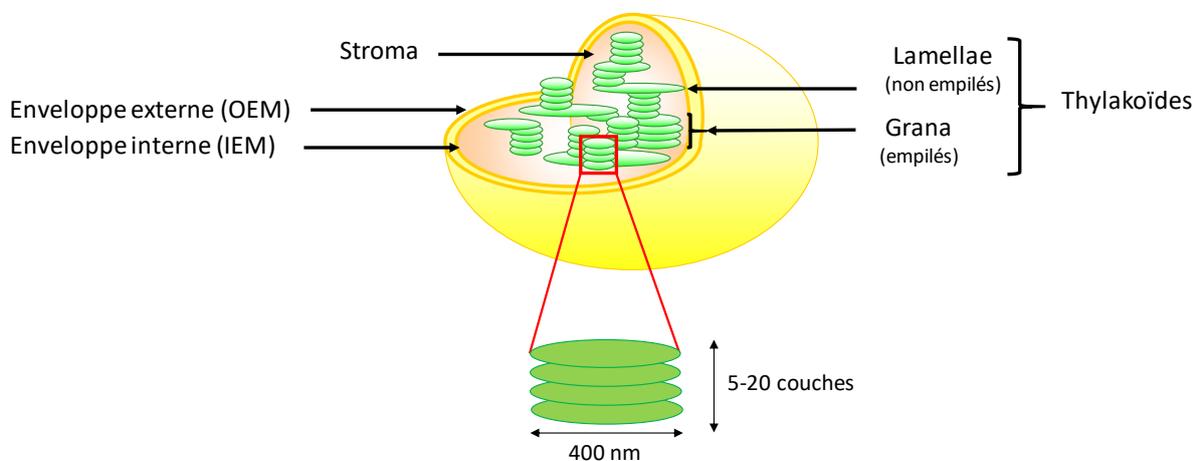


Figure 2 : Représentation schématique d'un chloroplaste délimité par une membrane externe (OEM) et une membrane interne (IEM). Présence des thylakoïdes correspondants aux membranes photosynthétiques baignant dans le stroma du chloroplaste.

La Figure 1 montre que les compartiments de la cellule végétale ne possèdent pas tous la même composition en lipides. En effet, les membranes du système endomembranaire ainsi que les mitochondries sont riches en phospholipides (en bleu), tandis que les membranes des chloroplastes sont riches en galactolipides (en vert) (Joyard *et al.*, 1998).

I. Les galactolipides

1) Définition

Les membranes des chloroplastes (Figure 2) ont une composition lipidique particulière conservée de façon remarquable des cyanobactéries aux plantes. Elles se caractérisent par la présence et l'abondance de galactolipides non chargés tels que le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) qui sont des glycérolipides. Ils représentent respectivement 53% et 27% des lipides membranaires des thylakoïdes des chloroplastes, soit environ 80 % des lipides totaux (Block *et al.*, 1983) (

Tableau 1, d'après la revue de (Kobayashi, 2016)). Les autres lipides, moins abondants, sont des glycérolipides anioniques comprenant le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et le phosphatidylglycérol (PG), qui est aussi un phospholipide.

		MGDG	DGDG	SQDG	PG	Others
Chloroplast	Thylakoids ^a	53	27	7	7	6
	Inner envelope ^b	49	30	5	8	8
	Outer envelope	17	29	6	10	38

^a Isolated from spinach leaves (wt%) (Dorne et al. 1990)

^b Isolated from spinach leaves (wt%) (Block et al.1983)

Tableau 1 : Composition lipidique de la membrane des chloroplastes végétaux. MGDG : monogalactosyldiacylglycérol, DGDG : digalactosyldiacylglycérol, SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol, PG : phosphatidylglycérol. Tiré de la revue de (Kobayashi, 2016).

2) Structure

Les galactolipides sont formés d'un glycérol, de deux acides gras (AG) estérifiés en position *sn-1* et *sn-2* du glycérol et, pour le MGDG, d'un galactose en *sn-3* du glycérol ou, pour le DGDG, de deux galactoses (Figure 3). Chez les plantes supérieures, les AG les plus fréquents ont une longueur de chaîne de 16 ou 18 atomes de carbone (C16 ou C18), allant d'espèces totalement saturées à des espèces insaturées avec trois doubles liaisons (0 à 3 insaturations du C16:0 au C16:3 et du C18:0 au C18:3). Selon les acides gras présents aux positions *sn-1* et *sn-2*, deux types de galactolipides peuvent être différenciés. Le premier se caractérise par la présence d'un AG en C16 en position *sn-2*; sa structure est appelée « procaryote » par

analogie avec celle des glycérolipides des cyanobactéries (Heinz, 1977). Le second possède des AG en C18 en position *sn*-2 uniquement; par opposition, sa structure est dite « eucaryote » (Joyard *et al.*, 1998). Certaines plantes comme le pois ont uniquement des galactolipides « eucaryotes » riches en C18:3 (plantes en C18:3). *Arabidopsis thaliana* et l'épinard, par contre, ont des galactolipides des deux structures (Freeman Allen *et al.*, 1964). Ils sont de ce fait, beaucoup plus riches en C16:3 (plantes en C16:3) (Heinz, 1977).

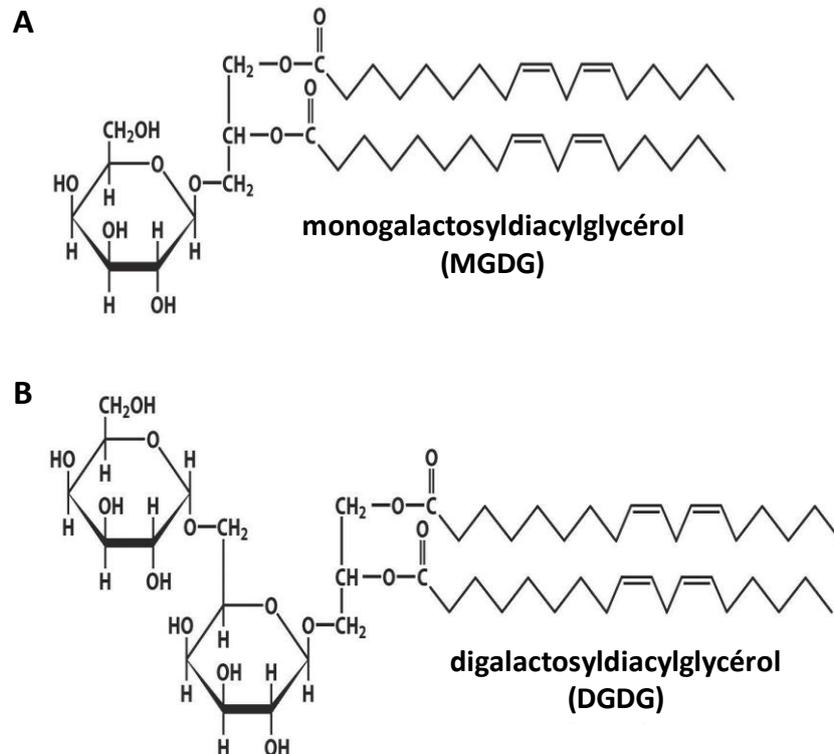


Figure 3 : (A) Structure du monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), (B) Structure du digalactosyldiacylglycérol (DGDG).

3) Biosynthèse des glycérolipides chez la plante

La synthèse des glycérolipides s'effectue en différentes étapes qui se déroulent dans des compartiments subcellulaires différents. La première étape est la synthèse des acides gras (AG). Elle s'effectue principalement dans le *stroma* des chloroplastes, tandis que la formation des glycérolipides a lieu sur deux sites majeurs : le système endomembranaire (le réticulum endoplasmique (RE)) où se produit la synthèse de la plupart des phospholipides ou

l'enveloppe du chloroplaste où s'effectue la synthèse des galactolipides et du PG chloroplastique.

a) Synthèse des acides gras

La première étape de synthèse des glycérolipides correspond à la synthèse des AG par l'intermédiaire d'une machinerie de synthèse appelée acide gras synthase (ou *Fatty Acid Synthase* (FAS)). Les AG sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe de longueur variable. Cette synthèse se situe dans le *stroma* des chloroplastes. Elle dépend de l'approvisionnement des plastes en substrats carbonés provenant du cytosol et qui vont être métabolisés en acétyl-CoA à l'intérieur du *stroma* (Fischer & Weber, 2002).

- Synthèse et élongation des chaînes carbonées des acides gras

La première étape de la synthèse des acides gras (AG) commence par la synthèse de malonyl-Coenzyme A (malonyl-CoA), réaction catalysée par une Acétyl-CoA Carboxylase (ACCase), système multienzymatique ATP dépendant, contenant de la biotine (Wakil *et al.*, 1958), qui carboxyle l'acétyl-CoA (Tong, 2013; Wakil *et al.*, 1983). Le malonyl-CoA est ensuite converti en *Malonyl-Acyl Carrier Protein* (malonyl-ACP), réaction catalysée par la ACP MALonylTransférase (MAT) par transfert du squelette malonyle sur l'*Acyl Carrier Protein* (ACP) (Joyard *et al.*, 2010). Le malonyl-ACP est le substrat utilisé pour l'élongation des chaînes d'AG catalysée par le complexe multienzymatique FAS. Ce complexe est composé de trois isoformes de la β -KetoAcyl Synthase (KASI, KASII, KASIII) (Figure 4) :

1. l'isoforme KASIII condense une molécule d'acétyl-CoA avec le malonyl-ACP pour former l'acéto acétyl ACP en C4 ;
2. les additions de carbones qui suivent sont catalysées par KASI, qui permet d'obtenir le palmitoyl-ACP en C16 ;
3. KASII permet d'obtenir le stéaroyl-ACP en C18.

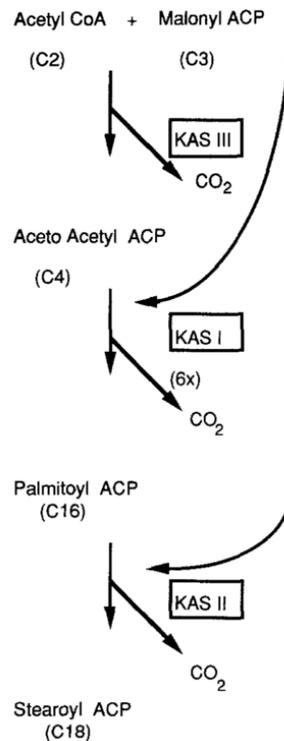


Figure 4 : Rôle du complexe FAS (Fatty Acid Synthase) dans la synthèse d'acides gras saturés. (Slabas & Fawcett, 1992).

L'ensemble de ces réactions permet ainsi de produire un acyl-ACP en C16 ou C18, qui peut être hydrolysé par des acyl-ACP thioestérases, au niveau de la membrane interne de l'enveloppe des plastes, produisant un acide gras libre (Figure 5).

Ces AG libres sont ensuite transférés vers la membrane externe de l'enveloppe des plastes où, par l'action d'une Acyl-CoA Synthase (ACS), ils sont réactivés en acyl-CoA donnant ainsi les substrats de nombreuses voies métaboliques (Rawsthorne, 2002), telle que la biosynthèse des glycérolipides dans l'enveloppe des plastes et dans le RE (Koo *et al.*, 2004).

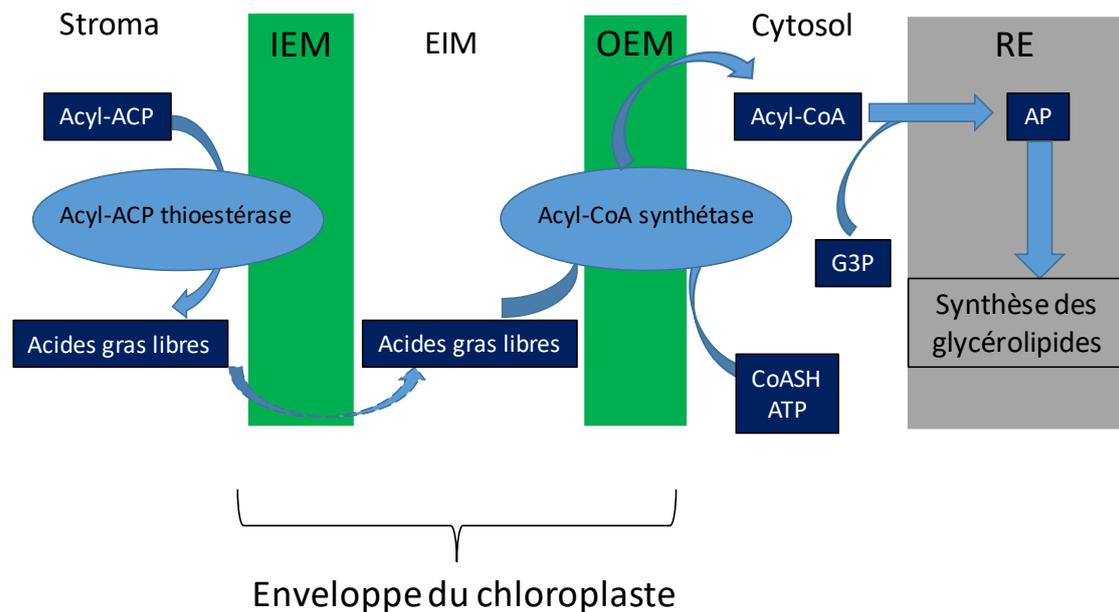


Figure 5 : Représentation schématique de la synthèse et de l'export des acides gras du stroma vers le cytosol.

- Processus d'insaturation

L'élongation des chaînes d'AG permet d'obtenir des AG saturés ; les insaturations sont mises en place ultérieurement. Des désaturases, spécifiques d'une position sur la chaîne carbonée et/ou de la longueur de la chaîne d'AG et/ou du lipide portant l'AG, catalysent l'addition des doubles liaisons. FAB2 (*Fatty Acid desaturase*) est ainsi spécifique du C18:0-ACP et le désature en C18:1-ACP dans le chloroplaste. Les désaturases incorporent une double liaison de type *cis*, à l'exception de la désaturase FAD5 (*Fatty Acid desaturase*) qui catalyse l'addition d'une double liaison de type *trans* sur le C16:0 en position *sn*-1 du PG du plaste (Ohlrogge & Browse, 1995). Les désaturations plus avancées des AG ont lieu dans le RE sur les glycérolipides formés, soit sur la phosphatidine choline (PC) (désaturases FAD2 et FAD3), soit dans les chloroplastes sur les glycérolipides, galactolipides ou PG, (FAD4 à FAD8). Plus il y a d'insaturations, plus la membrane sera fluide.

b) Formation des glycérolipides majeurs

L'acide phosphatidique (AP) et son dérivé déphosphorylé, le diacylglycérol (DAG), sont des intermédiaires généralement peu abondants, mais à l'origine de nombreux lipides différents.

En régulant des réactions enzymatiques clés, ils sont fondamentaux pour le métabolisme des glycérolipides.

- Synthèse de l'acide phosphatidique (AP)

L'AP est une molécule impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires et physiologiques de la plante (McLoughlin & Testerink, 2013). Il est impliqué dans sa croissance et son développement (Li *et al.*, 2009) ainsi que dans ses réponses aux stress (Distefano *et al.*, 2015; McLoughlin & Testerink, 2013). C'est à la fois un intermédiaire de synthèse et un lipide de signalisation qui peut s'accumuler de manière extrêmement rapide et transitoire en réponse à différents signaux environnementaux. Il est donc à la croisée entre le métabolisme membranaire et la signalisation physiologique (Galvan-Ampudia & Testerink, 2011; Testerink & Munnik, 2005).

A l'origine des deux types, on reconnaît deux types d'AP. Selon la nature de l'AG en position *sn*-2, la structure procaryote ou la structure eucaryote.

La synthèse de l'AP de structure procaryote s'effectue dans les plastes en deux étapes :

1. l'acylation du glycérol-3-phosphate (G3P) en position *sn*-1, catalysée par la glycérol-3-phosphate acyltransférase, appelée ATS1, dans les chloroplastes va donner le lysophosphatidate (LPA ou lyso-AP) ;
2. l'acylation en position *sn*-2 du LPA par ATS2 va donner l'AP.

Une partie de l'AP va permettre la synthèse de PG mais la plus grande quantité de l'AP va, par l'action d'une AP phosphatase, être déphosphorylée pour donner le diacylglycérol (DAG) (Figure 6) qui va permettre la synthèse de galactolipides dans le chloroplaste.

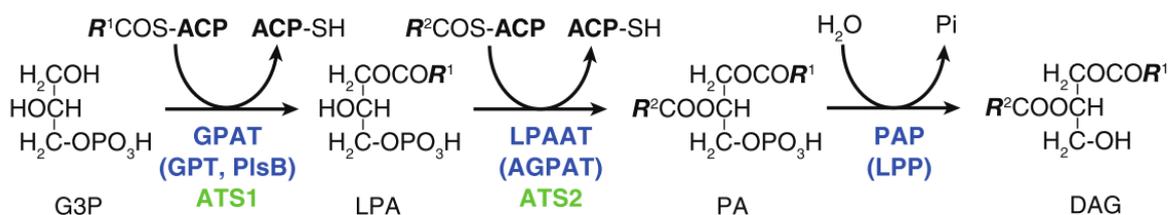


Figure 6 : Voie de synthèse du diacylglycérol (DAG) dans les chloroplastes. ACP: Acyl Carrier Protein, G3P: glycérol-3-phosphate, PA: acide phosphatidique, ATS1: nom des gènes, P_i : Phosphate inorganique, PAP: phosphatidase phosphatase (Sato & Awai, 2017).

Il est à noter que la ATS1 a une spécificité pour la position *sn*-1, favorisant les acyles à 18 carbones (Joyard & Douce, 1977; Yokoi *et al.*, 1998). ATS2 est présente dans l'enveloppe des chloroplastes (Joyard & Douce, 1977) et des plastes non chlorophylliens (Alban *et al.*, 1989). Elle transfère spécifiquement en position *sn*-2 un AG C16:0 caractéristique des lipides de type procaryote (Frentzen *et al.*, 1983). La spécificité de ATS2 ne permet pas la formation d'AP contenant des AG en C18 en position *sn*-2, ce qui explique l'incapacité des plastes à synthétiser des lipides de structure eucaryote (Yu *et al.*, 2004).

La synthèse de l'AP de structure eucaryote s'effectue dans le RE ou dans les mitochondries (Frentzen, 1990). La G-3-P acyltransférase (GPAT) du RE qui transfère les AG en position *sn*-1 du G3P n'a pas de spécificité particulière pour un type d'AG (exceptée la GPAT9 qui est impliquée dans la biosynthèse des triacylglycérols) (Singer *et al.*, 2016), alors que la deuxième acyltransférase, Lyso AP acyltransférase, est spécifique du C18-CoA produisant ainsi de l'AP de structure eucaryote (Figure 7). L'AP peut également être généré par l'action de la phospholipase D (PLD) sur la phosphatidylcholine (PC) issu du DAG de structure eucaryote (Botella *et al.*, 2017; Li-Beisson *et al.*, 2013) et serait ensuite transporté du RE vers l'enveloppe interne du chloroplaste (Wang *et al.*, 2012).

- Synthèse du diacylglycérol (DAG)

Le DAG est le précurseur direct de la formation des glycolipides plastidiaux MGDG et SQDG. Il peut être produit dans les chloroplastes par la voie dite « procaryote » (Figure 6) ou par la voie dite « eucaryote » dans le RE, selon l'origine de son précurseur, généralement l'AP (Browse *et al.*, 1986; Siebertz *et al.*, 1979) (Figure 7).

Le DAG est issu de l'AP par l'action d'une enzyme appelée phosphatidate phosphatase (PAP). Il existe plusieurs PAP extraplastidiales (cytosol, RE) et chloroplastiques (Block *et al.*, 1983; Joyard & Douce, 1979). La PAP chloroplastique possède la particularité d'avoir un pH de fonctionnement optimum alcalin et d'être inhibée par les ions Mg^{2+} . D'autre part, son activité est rétroinhibée par le DAG (Malherbe *et al.*, 1992). Cela contribue au contrôle du flux de DAG et d'AP, permettant de répondre à la demande de synthèse membranaire du chloroplaste et à celle du PG (Bastien *et al.*, 2016).

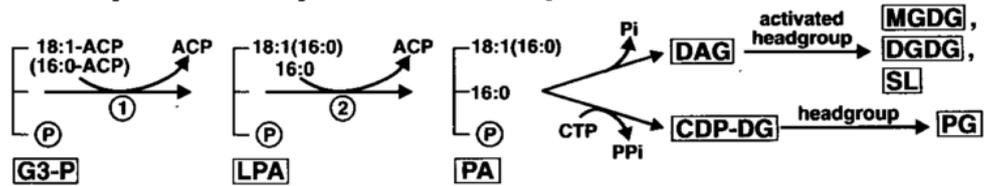
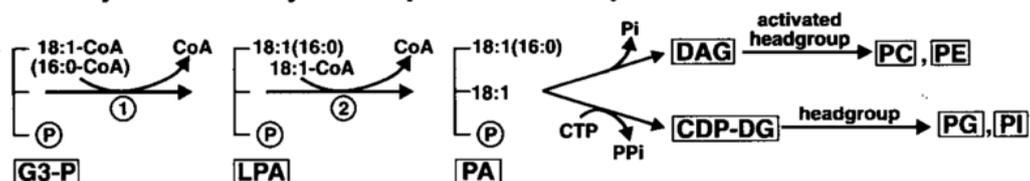
Prokaryotic Pathway - Plastidial compartment**Eukaryotic Pathway - Extraplantidial compartment**

Figure 7 : Synthèse des glycérolipides par la voie « procaryote » et « eucaryote ». Les réactions 1 et 2 sont catalysées par la glycérol-3-phosphate acyltransférase et la lysophosphatidique acid acyltransférase, respectivement. CDP-DG, cytidine diphosphate-diacylglycérol ; DAG, diacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; G3P, glycérol-3-phosphate ; LPA, monoacylglycérol-3-phosphate ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; PA, acide phosphatidique ; PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; SL, sulfoquinovosyldiacylglycérol (Ohlrogge & Browse, 1995).

Par la voie « eucaryote », le DAG permet de synthétiser des phospholipides telle que la phosphatidylcholine (PC). Dans les cellules végétales, la PC est un glycérolipide majeur de la plupart des membranes mais pratiquement absent des membranes internes des plastes (Botella *et al.*, 2017). La PC du chloroplaste peut être un précurseur possible de la biosynthèse des galactolipides eucaryotes. En effet, le DAG peut également être généré par l'action de phospholipase C (PLC) sur la PC en conservant leur structure d'origine (Li-Beisson *et al.*, 2013).

- Synthèse du phosphatidylglycérol (PG)

Le PG est le seul phospholipide conservé des cyanobactéries aux chloroplastes (Wada & Murata, 2007).

Toutes les membranes subcellulaires des cellules végétales contiennent du PG (Figure 8) mais dans les chloroplastes, il présente une structure procaryote particulière du fait de la présence en position *sn*-2 de C16:1 avec une insaturation de forme *trans* et non *cis* comme dans la plupart des lipides (Benson & Maruo, 1958; Loll *et al.*, 2005; Standfuss *et al.*, 2005), modifiant ainsi la structure tridimensionnelle de cet AG. Sa synthèse est confinée aux membranes du RE et des mitochondries et, pour le PG chloroplastique, à la membrane interne de l'enveloppe

des chloroplastes (Browse *et al.*, 1986; Frentzen, 2004). Dans les thylakoïdes, le PG interagit de manière spécifique avec différents complexes pigments-protéines et favorise l'oligomérisation du photosystème I (PSI), du photosystème II (PSII) et du complexe principal de capture de la lumière LHCI (Frentzen, 2004). En effet, des études cristallographiques ont montré que des molécules de PG étaient spécifiquement liées dans les formes cristallisées des trois complexes (Jordan *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Loll *et al.*, 2005; Standfuss *et al.*, 2005).

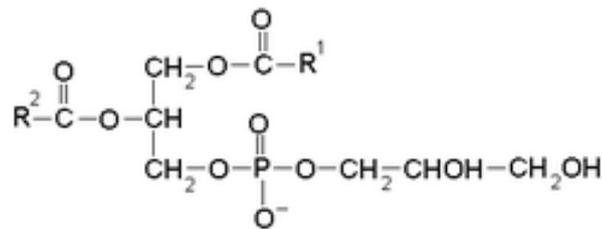


Figure 8 : Structure du phosphatidylglycérol (PG).

La synthèse du PG se fait par la conversion de l'AP en cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG), un précurseur fondamental pour la synthèse du PG (Xu *et al.*, 2006), par l'action d'une CTP phosphatidate cytidyltransférase également appelée CDP-diacylglycérol synthase (CDS). Le CDP-DAG est obtenu par une réaction entre une molécule de CTP et une molécule d'AP. Une réaction fait ensuite intervenir la phosphatidylglycérol-phosphate synthase (PGP1), qui va faire réagir le CDP-DAG avec du G3P pour former le phosphatidylglycérol-phosphate (PGP), puis une phosphatidylglycérol-phosphate phosphatase (PGP-P) va permettre de former le PG (Figure 9).

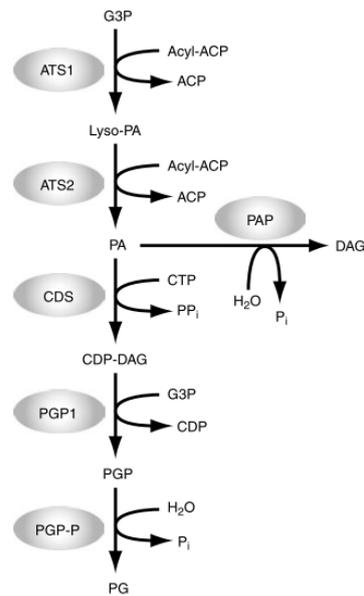


Figure 9 : Biosynthèse du phosphatidylglycérol (PG) dans les plastes d'*Arabidopsis thaliana*. ATS1, glycérol-3-P acyl-ACP acyltransférase ; ATS2, lysophosphatidic acid acyltransferase ; PAP, phosphatidic acid phosphatase ; CDS, CDP-diacylglycérol synthase ; PGP1, phosphatidylglycérolphosphate synthase ; PGP-P, phosphatidylglycérol phosphatase. ACP, acyl carrier protein; Acyl-ACP; acyl-acyl carrier protein; CDP-DAG, CDP-diacylglycérol; G3P, glycérol-3-phosphate; Lyso-PA, lyso-phosphatidic acid; PA, acide phosphatidique; PG, phosphatidylglycérol; PGP, phosphatidylglycérolphosphate (Xu et al., 2006).

- Synthèse du MGDG et du DGDG

Chez les plantes, la synthèse du MGDG est réalisée par les MGDG synthases (MGD), qui transfèrent un résidu galactose de l'uridine diphosphate- α -D-galactose (UDP-Gal) en position *sn*-3 du diacylglycérol (DAG), pour former le MGDG. Le MGDG, une fois produit, est le précurseur de la synthèse du DGDG. Tout le MGDG produit n'est pas converti en DGDG ; seulement une partie, en particulier celle issue de la voie « eucaryote », est utilisée par les DGDG synthases (Benning, 2009). La biosynthèse du DGDG se produit par le même mécanisme général chez les plantes et les cyanobactéries (Awai et al., 2007; Sakurai et al., 2007). La réaction est catalysée par des DGDG synthases qui transfèrent un galactose de l'UDP-Gal au MGDG pour produire le DGDG.

La Figure 10 présente une vue d'ensemble de la synthèse des glycérolipides dans la cellule végétale d'*Arabidopsis thaliana*. Chez *Arabidopsis* et beaucoup d'autres plantes, il existe donc deux voies pour la biosynthèse des lipides des plastes: (i) une première dans le plaste où les lipides sont directement assemblés *de novo* à partir d'AG nouvellement

synthétisés, et (ii) une deuxième où les AG sont exportés du chloroplaste avant leur assemblage en glycérolipides dans le RE par la voie « eucaryote » et leur ré-import sous forme de glycérolipides précurseurs (ou intermédiaires de synthèse) dans le plaste (Roughan *et al.*, 1980).

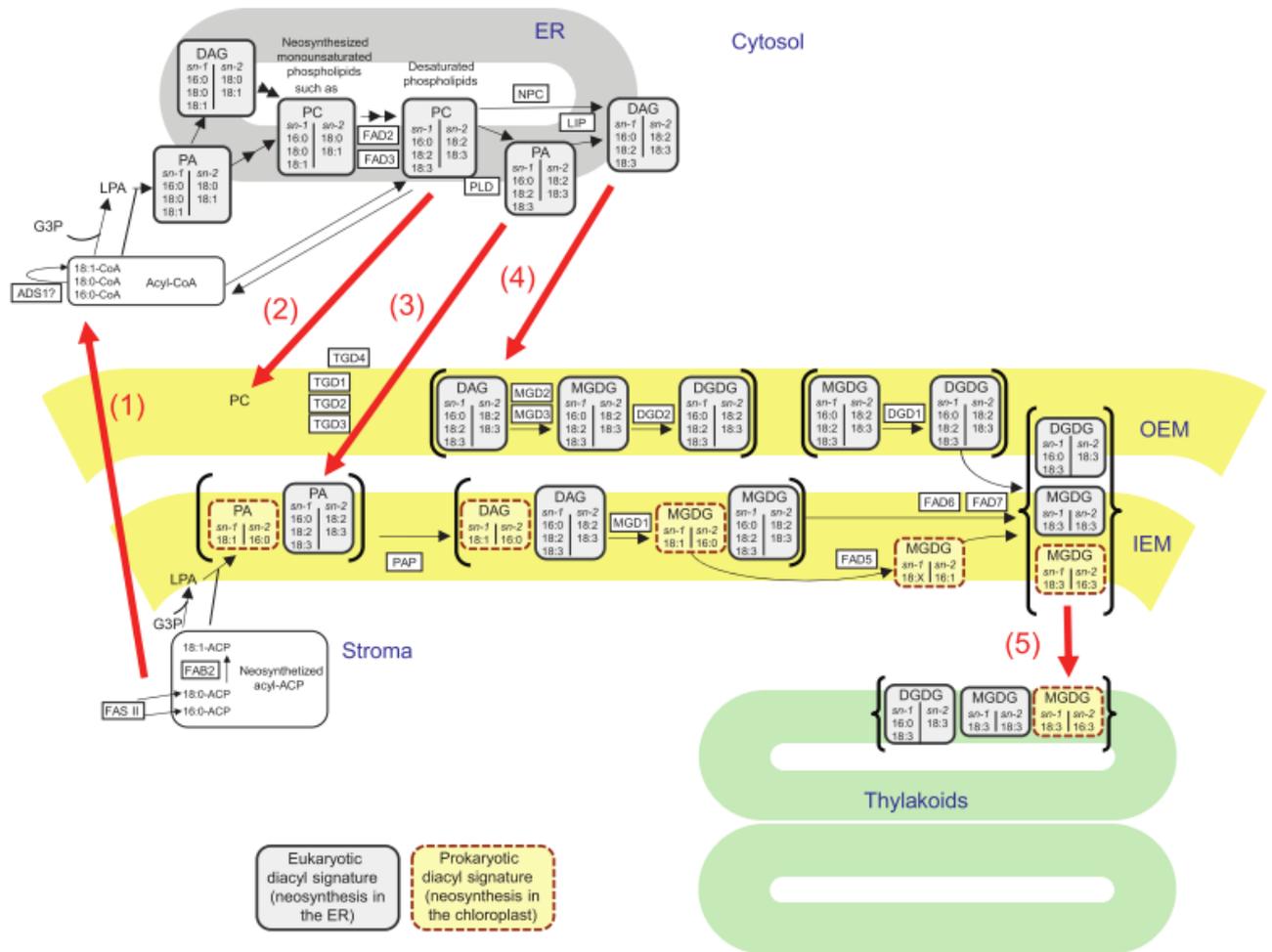


Figure 10 : Contribution de l'ER et de l'enveloppe chloroplastique à la biosynthèse des galactolipides chez *Arabidopsis thaliana*. La biosynthèse de novo des AG a lieu dans le stroma des chloroplastes. La production de précurseurs glycérolipidiques "eucaryotes" se produit dans le RE. La production de précurseurs glycérolipidiques "procaryotes" se produit dans l'enveloppe du chloroplaste. Pour chaque classe de lipides, le profil acyle est indiqué, y compris le nombre de carbones, l'insaturation du réseau (16:0 à 16:3 et 18:0 à 18:3) et les positions sn-1 et sn-2. Les intermédiaires glycérolipidiques "eucaryotes" et "procaryotes" sont mis en évidence en gris et en tirets, respectivement. Des flèches épaisses rouges indiquent les délocalisations lipidiques: (1) exportation de FA du stroma vers le cytosol; (2) importation de PC; (3) importation de PA; (4) Importation de DAG et (5) transfert de MGDG et de DGDG à des thylakoïdes précoces. Abréviations des compartiments cellulaires: ER, réticulum endoplasmique; IEM, membrane d'enveloppe interne; OEM, membrane d'enveloppe extérieure. Abréviations des métabolites lipidiques: ACP, acyl-carrier protein; DAG, diacylglycérol, DGDG, digalactosyldiacylglycérol, G3P, glycérol-3-phosphate; LPA, acide lyso-phosphatidique; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol; PA, acide phosphatidique; PC, phosphatidylcholine. Abréviations pour les protéines: ADS1, delta-9 acyl-lipide / CoA désaturase; DGD1 et DGD2, DGDGs synthases 1 et 2; FAB2, protéine désaturase du porteur delta-9 stéaroyl-acyle; FAD5, palmitoyl-MGDG-7-désaturase; FAD6, désaturase d'acide gras oméga-6; FAD7, désaturase d'acide gras oméga-3; FAS II, système multi-enzymatique de l'acide gras synthase de type II; LIP, homologue de la lipine phosphatidate phosphatase; MGD1, MGD2 et MGD3, MGDG synthases 1, 2 et 3; PNJ; phospholipase C non spécifique; PAP, phosphatidate phosphatase; PLD, phospholipase D; TGD1, TGD2 et TGD3, composants TGD phospholipidique transporteur ABC ; TGD4 protéine de liaison à l'acide phosphatidique associée au transporteur TGD (Bastien et al., 2016).

c) Trafic des galactolipides après leur synthèse

La synthèse des galactolipides est inégalement répartie entre les deux membranes de l'enveloppe, nécessitant un transfert lipidique entre les enveloppes et vers les thylakoïdes. La complexité de la biosynthèse et du transport des galactolipides des thylakoïdes provient du fait que quatre systèmes membranaires participent: (i) les membranes thylakoïdiennes en tant que receveur ultime des lipides polaires, (ii) la membrane interne de l'enveloppe plastidiale (IEM), (iii) la membrane externe de l'enveloppe plastidiale (OEM) et (iv) le RE (Benning, 2009) en tant que sites de synthèse.

La Figure 11 montre un schéma simplifié du transport et de la synthèse des galactolipides dans les chloroplastes. Concernant le transport des précurseurs de ces galactolipides, des complexes protéiques appelés TGD (complexe trigalactosyldiacylglycérol), ATP dépendant, ont été identifiés. Ils permettraient le transport de l'AP du RE à l'IEM. Ces transporteurs TGD sont constitués de 3 sous-unités : TGD1, TGD2 et TGD3 dans l'IEM, qui sont associées à une quatrième sous-unité qui se lie à l'OEM sous forme d'homodimère (Wang *et al.*, 2013, 2012; Xu *et al.*, 2010).

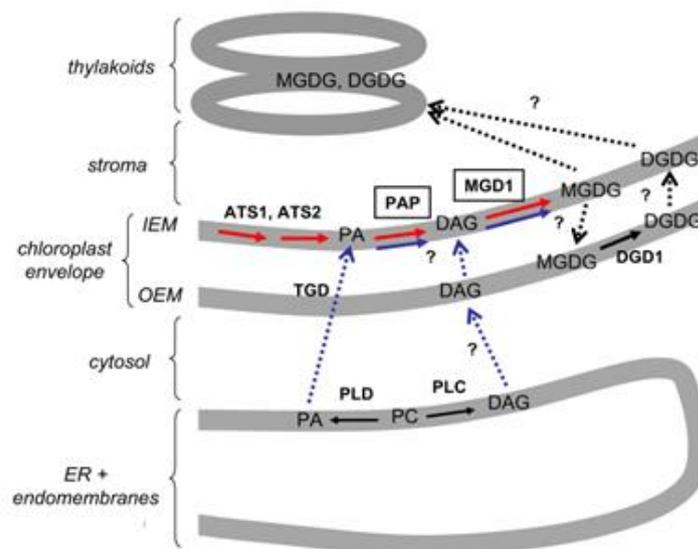


Figure 11 : Schéma simplifié du transport et de la synthèse des galactolipides dans les chloroplastes. MGD1 est localisée dans l'IEM, DGD1 est localisée dans l'OEM. La MGD1 permet d'obtenir du MGDG à partir du DAG et la DGD1 permet d'obtenir du DGDG à partir du MGDG. Deux structures moléculaires peuvent être synthétisées soit par la voie « procaryote » (localisée dans les chloroplastes, flèches rouges) soit par la voie « eucaryote » (localisée dans le RE, flèches bleues). PA, acide phosphatidique ; ATS1, ATS2, glycérol-3-phosphate acyltransférase ; PAP, PA phosphatase ; PC, phosphatidylcholine ; PLD, phospholipase D. TGD correspond à un complexe multiprotéique qui importe les molécules vers l'IEM. Le DAG pourrait être importé de l'IEM par un transporteur inconnu. Les systèmes de transport inconnus sont indiqués par des « ? » (Maréchal & Bastien, 2014).

Jusqu'à présent, les modes de transport des galactolipides (MGDG, DGDG) de l'IEM à l'OEM et inversement, ainsi que de l'IEM aux thylakoïdes, sont encore peu connus (Figure 11). Cependant, de récents travaux ont permis d'éclaircir certains points. En effet, un modèle est proposé selon lequel des fusions / associations membranaires entre l'IEM et l'OEM seraient médiées par l'interaction de l'AP et d'une séquence unique en position N-terminale de DGD1 (NDGD1). Cette association pourrait permettre le transfert de précurseurs lipidiques et de galactolipides entre les deux enveloppes tel que celui du MGDG de l'IEM vers l'OEM pour davantage de galactosylation et celui du DGDG de l'OEM vers l'IEM (Kelly *et al.*, 2016) (Figure 12).

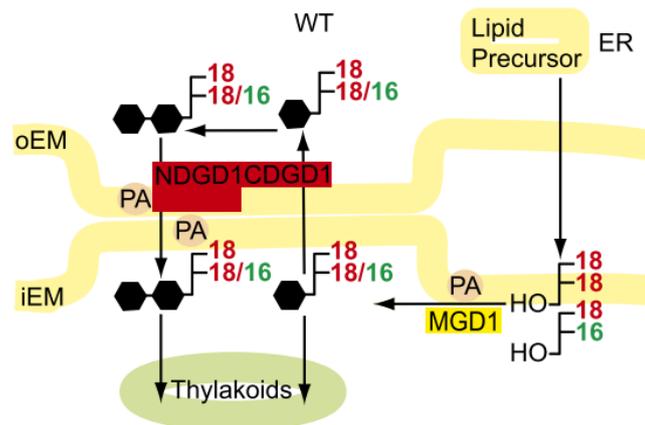


Figure 12 : Synthèse et transport de galactolipides dans les membranes d'enveloppe de chloroplastes. Chez *Arabidopsis thaliana*, les précurseurs de lipides eucaryotes dérivés du RE sont transportés dans le chloroplaste. Des diacylglycérols « procaryotes » dérivés de chloroplastes et importés sont utilisés pour la synthèse de MGDG par MGD1 dans l'IEM. Dans l'OEM, MGDG est converti en DGDG par DGD1 (NDGD1CDGD1). La liaison de NDGD1 à PA intervient dans l'association de l'IEM et de l'OEM, facilitant ainsi le transfert de MGDG de l'IEM vers l'OEM pour davantage de galactosylation et de DGDG de l'OEM vers l'IEM (Kelly *et al.*, 2016).

4) Rôles des galactolipides

Les galactolipides jouent de nombreuses fonctions dans la cellule végétale. En effet, des études ont montré l'implication des glycérolipides dans la biogenèse des thylakoïdes et le développement des chloroplastes, ainsi que dans la photosynthèse. Il est tout d'abord important de noter que le MGDG est le précurseur de la synthèse du DGDG, puisque en effet, le DGDG est issu de l'ajout d'un résidu galactosyle sur le MGDG (Kobayashi, 2016).

a) Rôle structural dans l'architecture des thylakoïdes

La composition lipidique des membranes chloroplastiques a été remarquablement conservée lors de l'évolution des cyanobactéries vers les plantes (Petroustos *et al.*, 2014). Au niveau structural, les galactolipides participent à l'architecture membranaire. Le MGDG et le DGDG ont des rôles uniques et irremplaçables avec des propriétés biophysiques très différentes dans la biogenèse et l'architecture des membranes chloroplastiques (Lee, 2000). En effet, le MGDG, par sa forme conique supposée due à sa petite tête polaire (le galactose à la pointe et les deux chaînes acyles gras orientées vers la base du cône) (Gounaris & Barber, 1983) déstabilise les bicouches lipidiques en formant des micelles inversées de type hexagonal II (Figure 13-A) (Jouhet, 2013; Webb & Green, 1991), phase la plus stable pour l'agrégation du MGDG où les têtes polaires se retrouvent face au centre des structures micellaires ou tubulaires. Cette propriété du MGDG pourrait être bénéfique dans des domaines membranaires très courbés ou à proximité de grands complexes protéiques. D'après de récents résultats, l'interaction entre la MGD1 et son produit le MGDG, formerait des structures de formes allongées, qui pourraient avoir un rôle dans l'échaffaudage (la formation) des prothylakoïdes issus de l'IEM (Sarkis *et al.*, 2014). Par ailleurs, la phase hexagonale II est favorable aux activités élevées de certaines enzymes, comme la violaxanthine de-epoxidase impliquée dans la régulation des oxydations par le cycle des xanthophylles dans les thylakoides à basses températures (Vieler *et al.*, 2008).

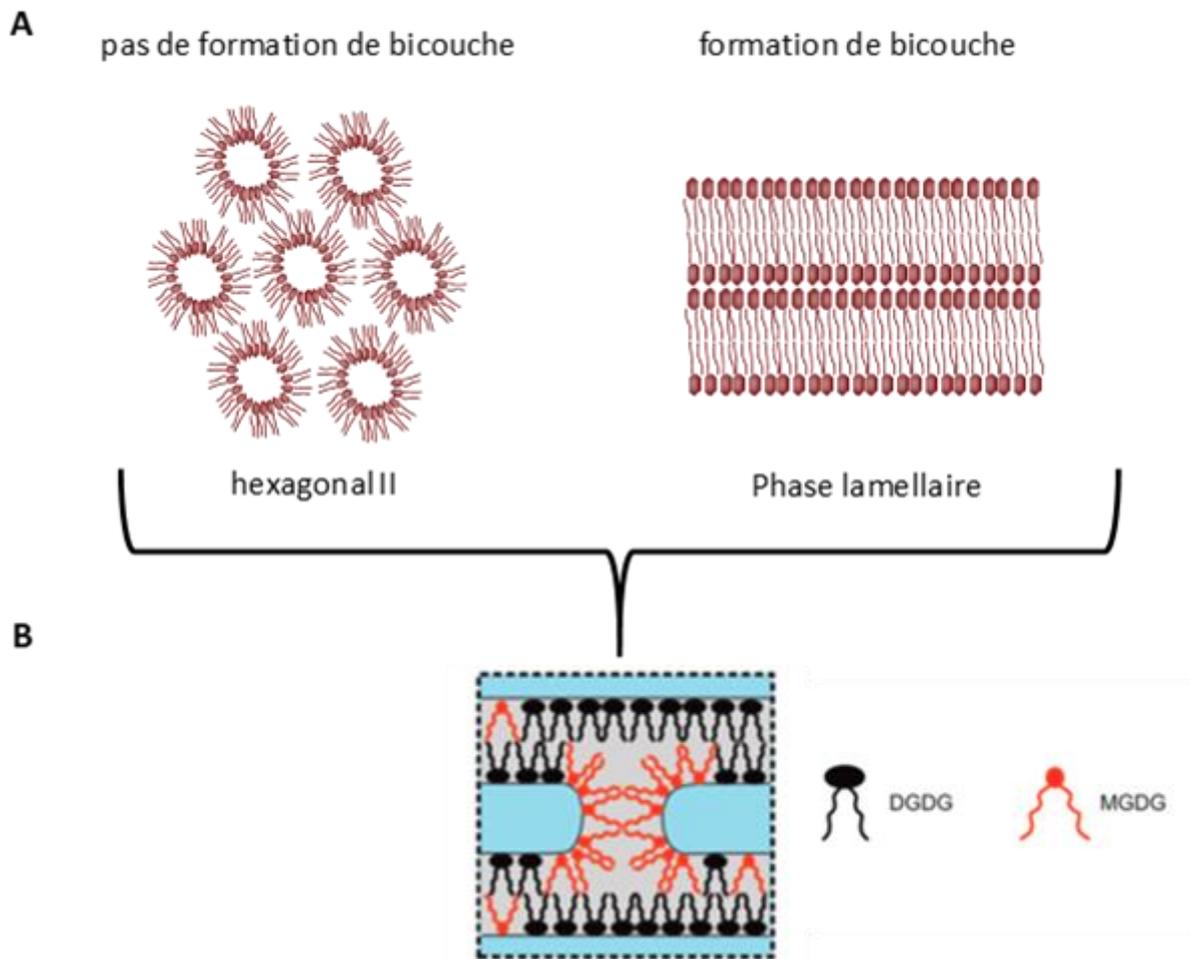


Figure 13 : (A) Structures formées par la présence de MGDG (à gauche) de type hexagonal II, et de DGDG (à droite) de type phase lamellaire (La), jouant un rôle dans l'architecture membranaire. (B) Structure engendrée par la présence de DGDG et de MGDG (Seiwert *et al.*, 2018).

Le DGDG, quant à lui, de forme cylindrique, est favorable à la formation des bicouches (Figure 13-B) (Boudière *et al.*, 2014; Gounaris & Barber, 1983; Gounaris *et al.*, 1986). Ces spécificités structurales des galactolipides contribuent à l'organisation des thylakoïdes et à la distribution fonctionnelle des photosystèmes PSI et PSII le long des thylakoïdes, le PSI étant fortement enrichi dans les membranes stromales et le PSII étant concentré dans les membranes empilées (Figure 14) (Hankamer *et al.*, 1997). Le maintien du ratio MGDG/DGDG constant dans les membranes thylakoïdiennes semble crucial pour la structure et la stabilité des membranes photosynthétiques (Demé *et al.*, 2014; Dörmann & Benning, 2002; Gounaris & Barber, 1983; Graham Shipley *et al.*, 1973). En effet, ce ratio est régulé en réponse à différents stress afin de maintenir les structures membranaires et les activités enzymatiques (Moellering & Benning, 2011).

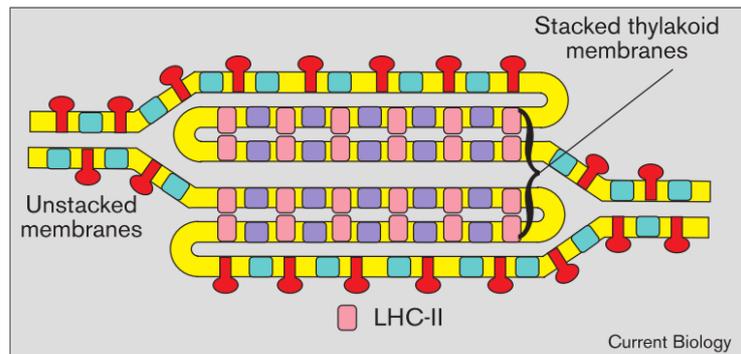


Figure 14 : Empilement de membranes thylakoïdes. Le LHC-II (light-harvesting chlorophyll-protein complexes II) est concentré dans la région empilée, avec d'autres protéines tels que le PSII et le complexe cytochrome b / f. D'autres protéines tels que le PSI et le complexe CF₁CF₀ (ATP synthase) sont concentrés dans les régions non empilées. L'empilement est véhiculé par les molécules du LHC-II. Les interactions entre les molécules du LHC-II rapprocheront les surfaces des membranes sollicitées. Cela pourrait permettre des interactions entre les groupes de tête du MGDG (Lee, 2000).

Des études ont montré que des membranes reconstituées à partir d'extraits lipidiques de thylakoïdes naturels pouvaient s'auto-organiser en bicouche membranaire et pouvaient passer de façon réversible de la phase hexagonale II (HII) à la phase lamellaire (L α) en jouant sur les concentrations respectives des espèces lipidiques et notamment, sur le rapport MGDG/DGDG. Cette transition de phase dépend également du niveau d'hydratation, qui peut être influencé par la composition en protéines de la membrane (Demé *et al.*, 2014).

b) Rôle dans le cas de carence en phosphate

Parmi les nombreux nutriments inorganiques requis par les plantes, le phosphate inorganique (P_i) est un des éléments les plus importants qui affectent de manière significative la croissance et le métabolisme des plantes. Il est l'un des substrats clés du métabolisme énergétique et de la biosynthèse des acides nucléiques et des membranes. Il joue également un rôle important dans la synthèse et la régulation d'un certain nombre d'enzymes. Cependant, la disponibilité du P_i est souvent limitée dans les sols et il peut facilement devenir limitant pour la croissance des plantes. Par conséquent, les plantes ont développé de nombreuses adaptations morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires pour acquérir du phosphate (Raghothama & Karthikeyan, 1999).

Les phospholipides constituent une réserve cellulaire majeure en P_i et leur quantité diminue considérablement dans les plantes pendant la privation de P_i (Essigmann *et al.*, 1998; Härtel *et al.*, 1998), alors que le niveau de DGDG augmente fortement et spécifiquement dans les cellules végétales cultivées dans des conditions dépourvues de P_i (Härtel *et al.*, 1998). Le DGDG a été trouvé dans la membrane plasmique (Andersson *et al.*, 2003), un compartiment membranaire déconnecté des membranes plastidiales mais relié dynamiquement au système endomembranaire, où se produisent des synthèses phospholipidiques majeures (phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE)). Il a été montré que dans des conditions dépourvues de P_i , de grandes quantités de DGDG sont présentes dans les mitochondries à la place de certains phospholipides (Jouhet *et al.*, 2004).

Les galactolipides vont donc jouer un rôle, lors de la carence en phosphate, en permettant à la cellule végétale de s'adapter. Dans ce cas, comme les glycolipides ne contiennent pas de phosphates, les phospholipides sont massivement hydrolysés (PC, PE et PG principalement) (Moellering & Benning, 2011) puis recyclés en glycolipides, notamment en DGDG au niveau des membranes plastidiales et extra-plastidiales (Andersson *et al.*, 2005; Härtel *et al.*, 2000; Jouhet *et al.*, 2004).

c) Rôle dans la photosynthèse

La membrane des thylakoïdes est le site des réactions photochimiques et du transport des électrons de la photosynthèse oxygénée, le processus par lequel la lumière est convertie en énergie chimique dans les plantes, les algues et les cyanobactéries. Le fait que la composition lipidique des membranes thylakoïdiennes soit conservée au cours de l'évolution (Sakurai *et al.*, 2006) indique déjà l'importance des galactolipides dans la photosynthèse. En plus de fournir une matrice de bicouche lipidique, les lipides des thylakoïdes sont intégrés dans les complexes photosynthétiques. Ces complexes regroupent un grand nombre de cofacteurs qui complètent l'acteur majeur, le PSII qui a la capacité de récolter de la lumière (Fromme & Grotjohann, 2008). Les photosystèmes I et II jouent un rôle important dans les processus de transport d'électrons (Kobayashi *et al.*, 2017). La cristallisation des complexes PSI et PSII issus de cyanobactéries a révélé que le MGDG est associé avec les noyaux des centres de réaction, indiquant que le MGDG pourrait être impliqué dans le transfert d'électrons dans les complexes photosynthétiques (Guskov *et al.*, 2009; Jordan *et al.*, 2001;

Kern & Guskov, 2011; Loll *et al.*, 2005; Umena *et al.*, 2011). Le MGDG se trouve à l'interface du dimère actif du PSII et favorise sa dimérisation, sachant que le PSII fonctionne en homodimère (Guskov *et al.*, 2009; Kansy *et al.*, 2014). Concernant le DGDG, il a également été trouvé dans les structures cristallographiques du PSII (Guskov *et al.*, 2009; Kern & Guskov, 2011; Umena *et al.*, 2011). Bien qu'il ne soit pas un composant essentiel de la croissance cellulaire (Kelly *et al.*, 2003; Sakurai *et al.*, 2007), le DGDG lie les protéines extrinsèques qui stabilisent le complexe (Gounaris *et al.*, 1983) (Tableau 2). En effet, l'absence de DGDG conduit au détachement des sous-unités externes du PSII, ce qui entraîne une diminution de l'activité du complexe de fractionnement de l'eau, enzyme oxydant l'eau, entouré par des protéines du PSII (Sakurai *et al.*, 2007). Le DGDG est également important pour le fonctionnement du complexe collecteur de lumière II (Light harvesting complex II ou LHCII) et le transport des électrons entre les systèmes de la photosynthèse (Ivanov *et al.*, 2006; Mizusawa & Wada, 2012; Sakurai *et al.*, 2007).

		Thylakoïde	PSI	PSII	Other	
Cyanobacteria	PSI	7.52	–	–	–	
	PSII	3.24	–	–	–	
	Lipids	Total	2350	30.1 (4)	64.8 (20)	2230
		MGDG	1020	7.52 (1)	19.4 (6)	995
		DGDG	602	0 (0)	16.2 (5)	586
		SQDG	583	0 (0)	13.0 (4)	570
PG	143	22.6 (3)	16.2 (5)	104		
Plants	PSI	2.25	–	–	–	
	PSII	2.99	–	–	–	
	Lipids	Total	1950	72.0 (32)	89.7 (30)	1790
		MGDG	840	45.0 (20)	15.0 (5)	780
		DGDG	510	11.3 (5)	12.0 (4)	487
		SQDG	380	0 (0)	9.00 (3)	371
PG	220	15.8 (7)	53.8 (18)	150		

Tableau 2 : Teneur en lipides (mmol.mol⁻¹ de chlorophylle) dans les membranes des thylakoïdes et les complexes photosynthétiques (Kobayashi *et al.*, 2017).

Les galactolipides permettent ainsi de maintenir et de stabiliser les photosystèmes (PSI et PSII) au niveau des membranes thylakoïdiennes (Boudière *et al.*, 2014; Dörmann & Benning, 2002; Jones, 2007; Kobayashi, 2016; Mizusawa & Wada, 2012). D'autres études impliquant des mutants de MGD1 ou de DGD1 d'*Arabidopsis thaliana* ont également montré ce rôle important des galactolipides dans la photosynthèse (Aronsson, 2008; Härtel *et al.*, 1997; Härtel, *et al.*, 1998; Jarvis *et al.*, 2000; Reifarth *et al.*, 1997).

d) Rôle dans la biogenèse des thylakoïdes

Les glycérolipides fournissent une matrice de bicouches lipidiques pour les complexes protéine-cofacteur photosynthétiques, de sorte que la composition lipidique affecte grandement la structure et les caractéristiques des membranes des thylakoïdes. Une déficience partielle en MGDG diminue la quantité de membranes des thylakoïdes, avec une altération de l'architecture chez *Arabidopsis* (Fujii *et al.*, 2014; Jarvis *et al.*, 2000). Il a été montré qu'une mutation knock-out (mgd1-2) de MGD1 d'*Arabidopsis* a entraîné une perte sévère de membranes des thylakoïdes avec une réduction substantielle de la teneur des deux galactolipides (Kobayashi *et al.*, 2007). A la place d'un réseau de membranes des thylakoïdes, des invaginations de la membrane interne de l'enveloppe ont été observées avec des structures vésiculaires immatures dans des plastes présents chez les mutants KO mgd1-2 (Kobayashi *et al.*, 2013, 2007). L'inhibition spécifique de la synthèse de MGDG par la galvestine-1 (inhibiteur de la MGD1) a également provoqué des structures invaginées à partir de la membrane interne de l'enveloppe (Botté *et al.*, 2011). La synthèse du MGDG est donc essentielle à la mise en place et à l'expansion des membranes thylakoïdiennes dans les tissus photosynthétiques. Le DGDG est également important pour la formation et la maintenance des membranes thylakoïdiennes. En effet, chez les mutants d'*Arabidopsis thaliana*, une déficience en DGDG affecte vraisemblablement la prolifération des thylakoïdes des chloroplastes et ralentit ainsi les processus de division cellulaire et de croissance de la plante (Dormann, 1995; Holzl *et al.*, 2009).

La régulation concertée de la biosynthèse des galactolipides et de l'expression des gènes photosynthétiques peut être importante pour synchroniser la formation de complexes photosynthétiques avec le développement des membranes thylakoïdiennes au cours de la biogenèse des chloroplastes (Kobayashi *et al.*, 2013). Récemment, un modèle de biogenèse des thylakoïdes a été proposé (Bastien *et al.*, 2016) (Figure 15). Le modèle proposé est un processus non lamellaire / non vésiculaire. La phase HII, riche en MGDG, est proposée pour permettre le transit des lipides tandis que dans les régions riches en DGDG, la transition de phase HII vers L α permettrait la génération quasi-instantanée de citernes membranaires. La présence de DGDG favorise les interactions membrane/membrane générant la forme aplatie des thylakoïdes embryonnaires.

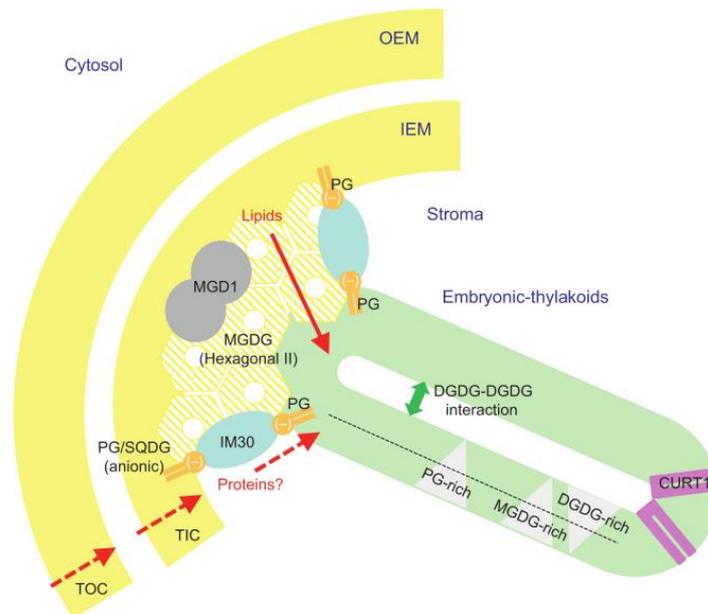


Figure 15 : Synthèse de thylakoïdes embryonnaire. Le modèle proposé est un processus non lamellaire / non vésiculaire. La phase hexagonale II riche en MGDG, dans la plateforme lipoprotéique riche en MGD1-MGDG, est proposée pour permettre le transfert de lipides. Dans les régions plus riches en DGDG, la transition de phase HII-La permettrait la génération quasi-instantanée de citernes membranaires. La présence de DGDG déclenche les interactions membrane-membrane, et donc la forme aplatie des thylakoïdes embryonnaires. Un tel modèle est en outre étayé par la proportion plus élevée de MGDG dans le feuillet stromal et la proportion plus élevée de DGDG dans le feuillet luminal. Même à de faibles concentrations, DGDG stimule l'empilement des membranes et peut également agir dans les interactions thylakoïde-thylakoïde. Il a été montré que IM30 (the inner membrane-associated protein of 30 kDa) interagit avec les lipides anioniques, tels que SQDG et PG, et peut donc agir entre l'IEM et les thylakoïdes, en cohérence avec la proportion plus élevée de PG dans le feuillet stromal des thylakoïdes. IM30 est également associé aux composants TIC. IM30 peut agir dans le transit des lipides et l'incorporation et l'assemblage correct des protéines thylakoïdes, y compris les photosystèmes. Les protéines CURT1 sont localisées dans des parties fortement incurvées de thylakoïdes matures (Bastien *et al.*, 2016).

II. Les glycosyltransférases (GTs)

1) Définition

Les glycosyltransférases (GTs) constituent une large famille d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des oligosaccharides, des polysaccharides et également des glycoconjugués tels que les galactolipides (Breton *et al.*, 2006). Ces enzymes présentent une grande diversité de fonction allant de la structure au stockage jusqu'à la signalisation. Le point commun de ces enzymes est leur capacité à catalyser une réaction de transfert d'un mono- ou oligo-saccharide à partir d'un donneur de sucre activé, nucléotide-sucre ou lipide-P-sucre sur une molécule acceptrice qui peut être de nature extrêmement variable (sucres, protéines, lipides, petites

molécules organiques, ...), par formation de liaison glycosidique (Figure 16). 90 % des GTs utilisent comme donneur de sucre un nucléotide-sucre (comme l'UDP-Galactose, ou le GDP-Fucose). Les GTs sont alors appelées « enzymes Leloir », en référence à Luis F. Leloir, qui fut celui qui découvrit le premier nucléotide-sucre (Leloir, 1964).

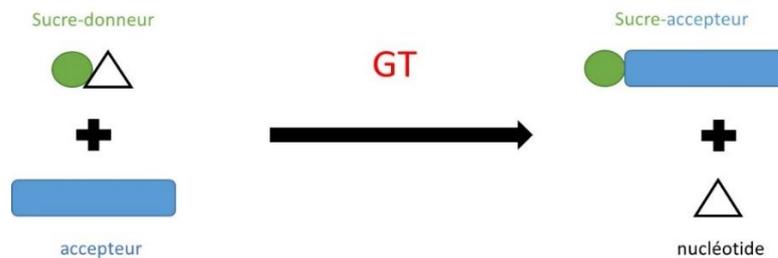


Figure 16 : Schéma d'une réaction catalysée par une glycosyltransférase (GT) : transfert du sucre issu du donneur (nucléotide-sucre) vers un accepteur avec libération du nucléotide.

2) Classification des GTs

Sur la base des identités de séquences en acides aminés obtenues après alignement de séquences, les GTs sont réparties à ce jour dans un peu plus de 100 familles distinctes, regroupées dans la base de données CAZy : Carbohydrate Active EnZyme Database (<http://www.cazy.org/>) (Cantarel *et al.*, 2009; Coutinho *et al.*, 2003). Les GTs sont nommées selon la nature du monosaccharide transféré et le type de liaison formée avec l'accepteur. Le nombre de famille augmente au fur et à mesure avec la découverte de nouveaux gènes de glycosyltransférases. De nombreuses différences sont observées parmi les familles notamment par rapport à leurs fonctions et le nombre de séquences qu'elles peuvent regrouper. En effet, dans certaines grandes familles, il peut y avoir de nombreuses fonctions biochimiques différentes. Ces familles sont dites poly-spécifiques. A l'opposé, d'autres familles, peu nombreuses, ne contiennent qu'un petit nombre de séquences avec une seule fonction identifiée. Ces familles sont dites mono-spécifiques (Breton *et al.*, 2006). Cette classification basée sur les identités des séquences est supposée conférer des caractéristiques structurales et mécanistiques communes aux GTs d'une même famille (Breton *et al.*, 2006). La base de données CAZy est un outil prédictif puissant au niveau structural. Il est cependant extrêmement difficile de prédire la fonction biochimique précise d'une séquence de GT (nature des substrats donneur et accepteur) sur la base des homologies de séquence.

3) Structures et mécanismes réactionnels

a) Structures

Une classification basée sur les séquences répartit, nous l'avons vu, les GTs dans de nombreuses familles, reflétant ainsi la très grande variété des réactions de glycosylation des molécules du vivant. En revanche, ces familles d'enzymes sont caractérisées par une architecture tridimensionnelle très conservée. En effet, pour les GTs utilisant un nucléotide-sucré, deux types principaux de repliements ont été identifiés, appelés GT-A et GT-B.

La structure de type GT-A est constituée d'un domaine de type Rossmann (consistant en un sandwich $\alpha/\beta/\alpha$), situé dans la partie N-terminale du domaine catalytique (domaine de liaison au nucléotide, NBD pour *Nucleotide Binding Domain*), accolé à un second domaine de structure plus variable (domaine de liaison à l'accepteur, ABD pour *acceptor binding domain*). L'association des deux va former le site actif de l'enzyme (Figure 17-a). A de rares exceptions près, les GTs de type GT-A nécessitent la présence de cations divalents tel que le Mn^{2+} pour leur activité (Breton & Imberty, 1999; Breton *et al.*, 2006).

La structure de type GT-B est constituée de deux domaines Rossmann, séparés par une région de connexion et un site catalytique situé entre ces domaines (Figure 17-b). Cette structure montre généralement une très bonne conservation du domaine C-terminal, qui correspond au domaine de liaison au donneur (NBD), ce qui est moins le cas pour le domaine N-terminal, qui correspond au domaine de liaison à l'accepteur (ABD), qui lui, présente beaucoup plus de variabilités selon la nature de l'accepteur.

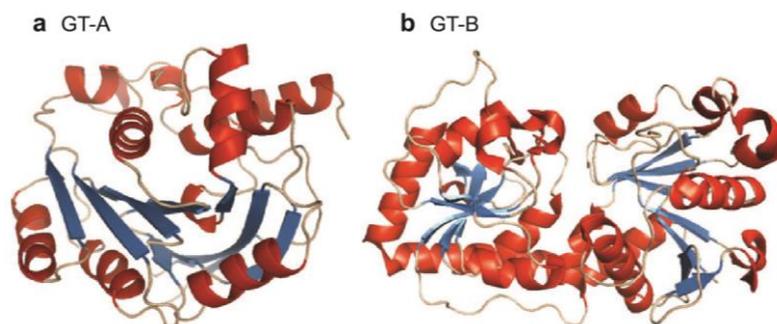


Figure 17 : Les deux principaux types de repliements chez les glycosyltransférases (a) GT-A, (b) GT-B (Lairson *et al.*, 2008).

b) Mécanismes réactionnels

Le transfert du sucre peut s'effectuer selon un mécanisme de maintien ou d'inversion de la configuration de son carbone anomérique (Figure 18). En effet, deux résultats stéréochimiques sont possibles pour les réactions qui aboutissent à la formation d'une nouvelle liaison glycosidique : la configuration anomérique du produit peut être conservée (GT dite « retaining ») ou inversée (GT dite « inverting ») par rapport au substrat donneur, nécessitant ainsi différents mécanismes catalytiques pour ces deux classes d'enzymes (Figure 18) (Lairson *et al.*, 2008).

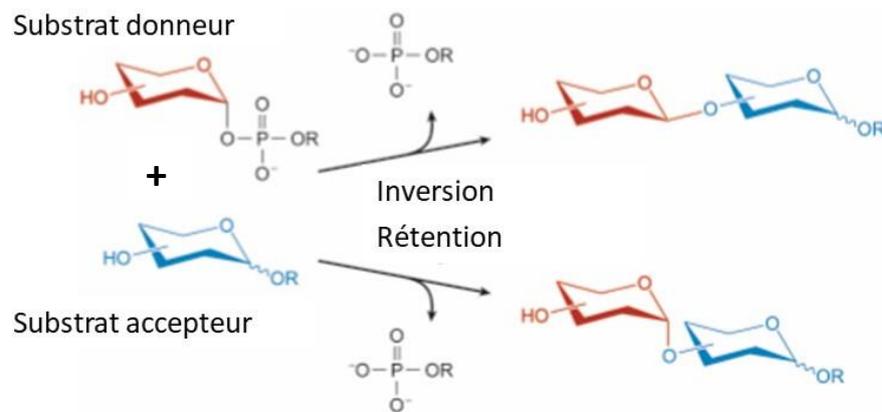


Figure 18 : Transfert du groupement glycosyle avec le mécanisme d'inversion ou de rétention du carbone anomérique (Lairson *et al.*, 2008).

Le mécanisme généralement proposé pour les GTs dites « inverting » est celui d'une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 (type S_N2), au cours de laquelle un acide aminé (le plus souvent il s'agit d'un Asp, Glu ou His) joue le rôle de base catalytique qui va déprotoner le groupement OH de l'accepteur, rendant ce dernier nucléophile et lui permettant d'attaquer le donneur. Ce mécanisme s'accompagne de la formation d'un état de transition de type ion oxocarbénium.

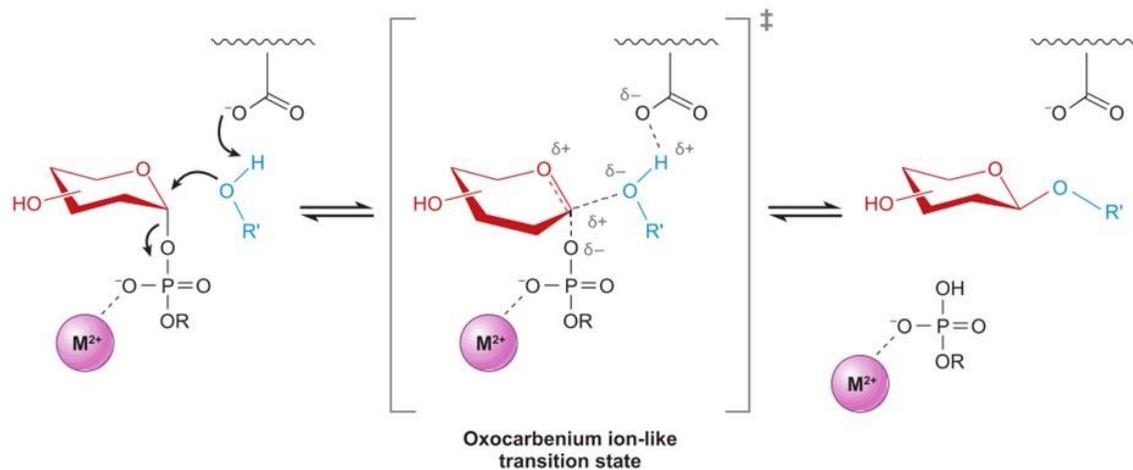


Figure 19 : Mécanisme des GTs de type « inverting » avec une réaction de type S_N2 . Il y a une inversion de la configuration du carbone anomérique en passant par un état de transition de type ion oxocarbenium. R : nucléoside, nucléoside monophosphate, un lipide phosphate ou un phosphate ; R'OH : groupement accepteur. Dans ce cas, l'acide aminé catalytique est l'acide aspartique (Lairson *et al.*, 2008).

Le mécanisme des GTs dites « retaining » reste plus controversé (Figure 18) (Albesa-Jové & Guerin, 2016; Breton *et al.*, 2012; Coutinho *et al.*, 2003). Pour certains membres de cette classe, il a été proposé un mécanisme à double déplacement de type S_N2 impliquant la formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent. Un autre mécanisme de type S_{Ni} -like a été proposé, qui implique une attaque nucléophile et le départ du groupement phosphate de façon concertée mais asynchrone sur la même face du sucre. Ce dernier mécanisme semble être le plus répandu et le plus accepté à ce jour (Albesa-Jové *et al.*, 2017).

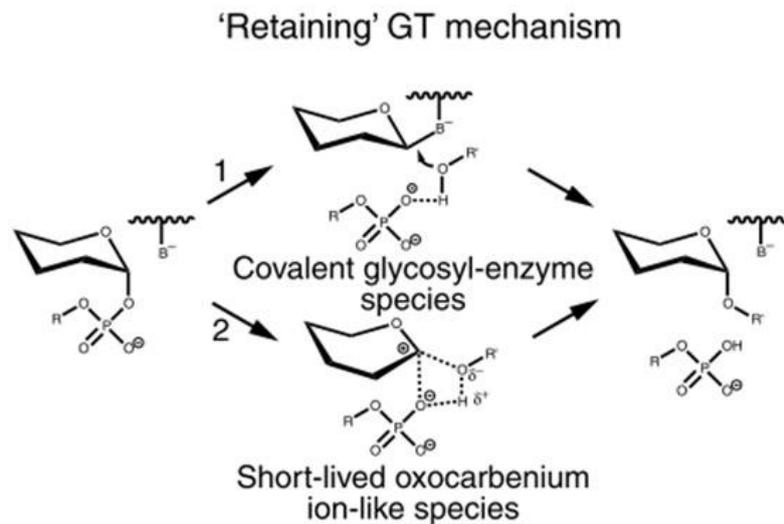


Figure 20 : Mécanismes des GTs de type « retaining » impliquant soit un double déplacement de type S_N2 , avec formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent (1) ou un mécanisme S_{Ni} -like (2) (Albesa-Jové & Guerin, 2016).

III. Les monogalactosyldiacylglycérol synthases (MGDG synthases)

1) Phylogénie

La conservation du MGDG et du DGDG des cyanobactéries aux plantes suggère que les phénomènes de sélection auraient pu conserver les enzymes impliquées dans leur biosynthèse, mais cela ne semble pas être le cas. En effet, il y a différentes transitions évolutives importantes. L'endosymbiose primaire (d'une cyanobactérie photosynthétique symbiotique (Nelissen *et al.*, 1995) avec une cellule hôte non photosynthétique (McFadden, 2001)) qui a conduit aux chloroplastes primaires. Sur la base des pigments photosynthétiques, du matériel de stockage et des parois cellulaires, trois lignées de ces eucaryotes porteurs de plastes primaires ont divergé, dont celle des plantes avec *Arabidopsis thaliana*. L'endosymbiose secondaire, d'un alcali unicellulaire symbiotique à un plaste secondaire (Petroustos *et al.*, 2014).

Les cyanobactéries ancestrales et les chloroplastes des plantes supérieures partagent des caractéristiques communes dans de nombreux phénomènes biologiques, y compris la photosynthèse et la division cellulaire, et les composants de la machinerie photosynthétique (Osteryoung & Vierling, 1995; Wolfe *et al.*, 1994) (Figure 21). Les MGDG synthases sont hautement conservées des algues aux plantes. Cependant, la synthèse des galactolipides

diffère entre les cyanobactéries et les plantes (Awai, 2016). Chez les plantes, une seule étape est requise tandis que chez les cyanobactéries, le MGDG est formé en deux étapes. La première étape implique une glucosyltransférase, qui transfère le résidu glucose de l'UDP- α -D-glucose sur le DAG pour donner le Glc β -DAG (MGlcDG) (Awai, 2006). Dans une seconde étape, une épimérase convertit le glucose de MGlcDG en galactose, produisant du MGDG (Awai *et al.*, 2014). Des analyses phylogénétiques l'expliqueraient par un événement de transfert de gènes horizontal chez un ancêtre des MGDs de l'espèce des *Chloroflexi* qui aurait eu lieu parallèlement à l'événement endosymbiotique majeur et qui aurait contribué à la première évolution plastidienne (Yuzawa *et al.*, 2012) (Figure 21).

Après l'acquisition, la duplication de MGD et la différenciation fonctionnelle de deux types de MGD, les types A et B, ont eu lieu en même temps que l'évolution des plantes terrestres. Cette différenciation fonctionnelle avait probablement des significations importantes dans la prospérité future des plantes à graines. Il est universellement admis qu'une cyanobactérie ancestrale est à l'origine de l'organelle de plastide. Cependant, l'évolution des plastides est encore très controversée. Ces désaccords peuvent être attribués à un processus très complexe de financement impliquant un transfert de gènes à la fois horizontal et intracellulaire au cours de l'évolution procaryote et eucaryote.

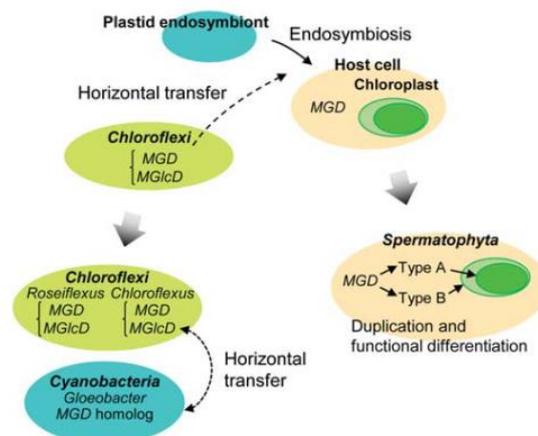


Figure 21 : Modèle d'évolution des MGDG synthases. La duplication et la divergence fonctionnelle sont survenues chez les spermatophytes. Les flèches pointillées en noir indiquent un transfert de gène horizontal. Les grandes flèches noires ombragées indiquent une progression évolutive (Yuzawa *et al.*, 2012).

2) Les MGDG synthèses de *Arabidopsis thaliana* (MGD1, MGD2, MGD3)

Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe trois MGDG synthèses fonctionnelles : MGD1, MGD2, MGD3 qui permettent d'initier la synthèse des galactolipides, une des activités enzymatiques essentielles dans la biogenèse des membranes des thylakoïdes (Jarvis *et al.*, 2000). Elles appartiennent toutes à la famille GT 2. Elles ont été identifiées et classées en type-A (MGD1) ou type-B (MGD2 et MGD3) d'après leur identité de séquences (Awai *et al.*, 2001). Elles diffèrent selon leur spécificité de substrat, leur localisation subcellulaire et leur profil d'expression génique. En particulier, la protéine de type A est caractérisée par la présence à son extrémité N-terminale d'un peptide de transit chloroplastique (Ctp) clivable de ~ 100 acides aminés, alors que le type B présente une courte séquence d'adressage de ~ 30 résidus non clivable (Awai *et al.*, 2001).

La MGD1 est l'isoforme principale, la plus abondante et la plus active. Des études de mutants de MGD1 ont montré qu'elle est responsable de la biosynthèse de l'essentiel des galactolipides dans les tissus photosynthétiques (Jarvis *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007). La MGD1 est localisée dans l'enveloppe interne des membranes des chloroplastes (Miège *et al.*, 1999; Vojta *et al.*, 2007; Xu, 2005), tandis que les deux autres, MGD2 et MGD3, sont présentes au niveau de l'enveloppe externe (Jarvis *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007) (Figure 22).

Les isoformes MGD2 et MGD3 sont essentiellement présentes dans les tissus non photosynthétiques. En carence de phosphate inorganique (P_i), les plantes activent une autre voie impliquant MGD2 et MGD3, afin de fournir du DGDG supplémentaire qui va être exporté vers les membranes extra-plastidiales, où il va remplacer partiellement les phospholipides (Awai *et al.* 2001; Kobayashi *et al.* 2009; Härtel *et al.* 2000). La forte expression de MGD2 et de MGD3 est également observée au cours de la maturation du pollen et de la croissance du tube pollinique (Kobayashi *et al.*, 2004), soulignant la possibilité que ces isoformes jouent un rôle dans la reproduction.

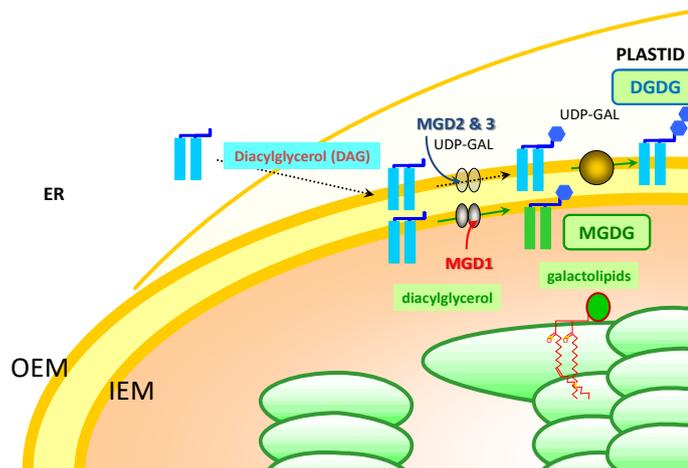


Figure 22 : Localisation cellulaire des MGDs chez *Arabidopsis thaliana*. MGD1 est localisée au niveau de l'IEM tandis que MGD2 et MGD3 sont localisées au niveau de l'OEM des chloroplastes. (Figure provenant de Eric Maréchal)

Un mutant KO de MGD1 chez *Arabidopsis thaliana* a montré une absence de galactolipides et une perturbation des membranes photosynthétiques, conduisant à une altération complète de la capacité photosynthétique et de la croissance photo-autotrophe (Kobayashi *et al.*, 2007). De plus, le mutant KO *mgd1-1* (Jarvis *et al.*, 2000) a conduit à une diminution de la teneur en chlorophylle, une altération de la structure chloroplastique avec moins de thylakoïdes. Le KO de MGD1 chez le mutant KO *mgd1-2* (Kobayashi *et al.*, 2007) est létale en l'absence d'une source externe de carbone organique. Des études utilisant la galvestine-1, un inhibiteur des MGDG synthèses, ont confirmé ce rôle vital (Botté *et al.*, 2011).

Par contre, des mutants KO de MGD2 ou MGD3 et le double mutant n'ont montré aucun phénotype frappant dans des conditions de croissance standard (Kobayashi *et al.*, 2009), ce qui montre que ces enzymes ne sont pas indispensables dans les conditions normales (en absence de stress). Ces données ont ainsi confirmé que, dans les tissus photosynthétiques, la fonction de MGD1 joue un rôle majeur dans la biosynthèse des galactolipides, et que MGD2 ou MGD3 ne peuvent pas compenser une perte de la fonction de MGD1. Le type-B (MGD2 et MGD3) n'a donc pas de rôle important dans le développement de la plante, mais ces isoformes sont cruciales pour remodeler les membranes lipidiques durant les conditions de privation en P_i (Kobayashi *et al.*, 2009).

3) La MGD1 (Etat de l'art)

a) Fonction

MGD1 est une enzyme membranaire monotopique ancrée dans l'IEM des chloroplastes (Maréchal *et al.*, 1995; Miège *et al.*, 1999). MGD1 transfère le résidu galactosyle de l'UDP-Galactose sur le diacylglycérol pour former le MGDG (Figure 23). Le MGDG, une fois produit, est transféré du côté de l'OEM, où le DGDG va être synthétisé par les DGDG synthases. Une partie seulement sert à former le DGDG, l'autre est exportée vers l'OEM.

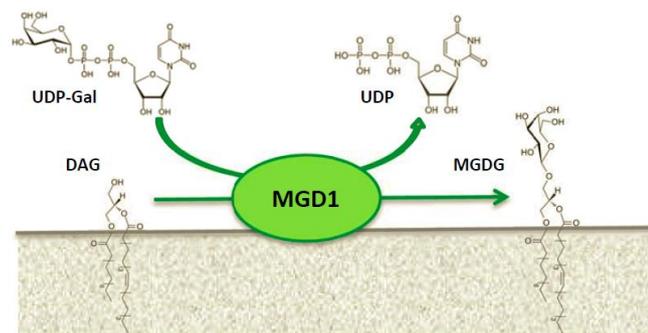


Figure 23 : Réaction de MGD1 qui transfère un résidu galactosyle du donneur UDP-gal sur un diacylglycérol (DAG) pour former le MGDG (Rocha *et al.*, 2016).

b) Localisation

A ce jour, la localisation exacte de MGD1 est encore en débat. Il a longtemps été pensé que MGD1 était orientée vers l'espace intermembranaire, à cause de l'absence apparente d'UDP-Galactose dans les spectres RMN du stroma chloroplastique (Maréchal *et al.*, 1995; Miège *et al.*, 1999). De nouvelles avancées ont montré que la présence d'une épimérase catalysant la conversion de l'UDP-Glucose en UDP-Galactose dans le stroma chloroplastique était essentielle pour la biosynthèse des galactolipides chez le riz (Li *et al.*, 2011). Il est donc possible que l'UDP-Gal soit disponible dans le stroma et que MGD1 soit orientée vers l'intérieur ou qu'un transporteur d'UDP-Gal existe au niveau de l'IEM. MGD1 pourrait donc être exposée au côté stromal et/ou à l'espace intermembranaire de l'IEM. En effet, cette plateforme HII où MGD1 se localise préférentiellement permet peut-être à MGD1 de créer un continuum entre le stroma des chloroplastes et sa position supposée sur la face externe de l'IEM.

c) Structure

Les homologues structuraux les plus proches de MGD1 sont les glycosyltransférases bactériennes nécessaires à l'assemblage du peptidoglycane (MurG, de la famille GT28) ou impliquées dans la synthèse des antibiotiques calichéamicine (CalG1, de la famille GT1) et oléandomycine (OleI, de la famille GT1) (Bolam *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2003). L'alignement basé sur la structure de MGD1 avec ces homologues structuraux montre une bien meilleure conservation de leur domaine C-terminal, indiquant des caractéristiques conservées dans l'accommodation du sucre donneur. Concernant le domaine N-terminal, les variations sont bien plus importantes, reflétant ainsi la diversité de leur substrat donneur.

La séquence primaire de MGD1 possède un peptide de transit chloroplastique en position N-terminale (acides aminés 1 à 106). Celui-ci est suivi d'une courte séquence (acides aminés 107 à 136), prédite comme étant désordonnée et non nécessaire à l'activité de l'enzyme (Dubots *et al.* 2010). Le domaine catalytique se situe ensuite entre les acides aminés 137 et 533.

La structure de MGD1, récemment résolue au laboratoire dans sa forme apo-enzyme (code PDB : 4WYI) et en complexe avec l'UDP (code PDB : 4X1T) permet de se faire une idée plus précise de son mode d'action et de son interaction avec la membrane (Rocha *et al.*, 2016). MGD1 adopte le repliement classique de type GT-B, dans lequel le domaine C-terminal correspond au domaine de liaison au nucléotide-sucre tandis que le domaine N-terminal semble vraisemblablement impliqué dans la liaison à l'accepteur DAG. Une des particularités mise en avant par la résolution de la structure, est la présence d'une large boucle désordonnée (non visible dans la structure cristallographique) qui s'est révélée être importante pour l'activité de l'enzyme et pour la liaison avec le DAG (Figure 24). En effet, la suppression d'une partie de cette région a eu une incidence considérable sur la capacité de liaison au DAG. Le modèle actuel propose que MGD1 soit insérée dans la bicouche essentiellement par son domaine N-terminal *via* cette région flexible (Rocha *et al.*, 2016) et que cette large région flexible soit essentielle pour la capture du DAG accepteur (Figure 25).

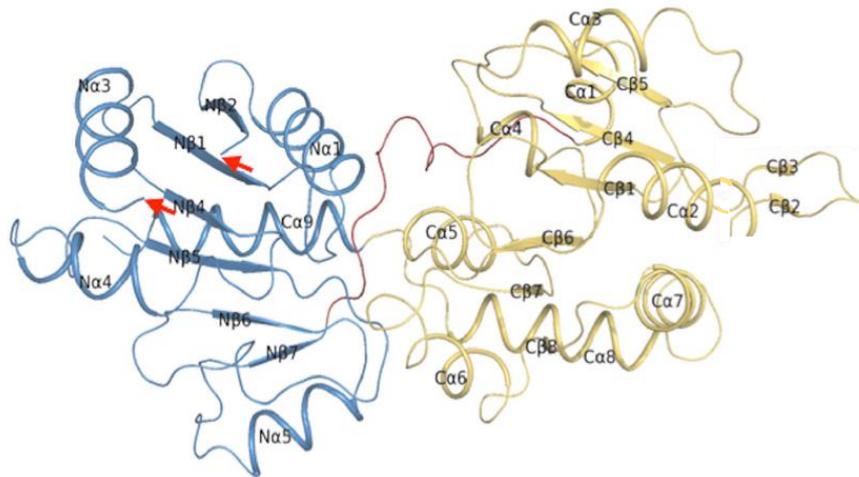


Figure 24 : Structure de MGD1 d'*Arabidopsis thaliana*. Le domaine N-terminal est en bleu, le domaine C-terminal est en jaune, la région d'interconnexion est en rouge. Les flèches rouges montrent les extrémités de la région de la protéine non visible dans l'apo-enzyme (Rocha *et al.*, 2016).

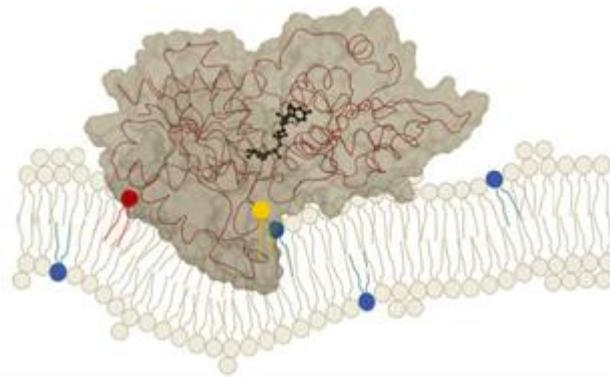


Figure 25 : Représentation schématique de MGD1 liée à la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. Dans le modèle proposé, le domaine N-terminal de la MGD1 s'insère dans la bicouche par des contacts entre sa région désordonnée d'une part et le PG (en bleu) et le MGDG (en gris) d'autre part, afin d'accéder au DAG (en jaune). L'AP est en rouge (Rocha *et al.*, 2016).

d) Mécanisme réactionnel

Basé sur l'accumulation de données structurales et biochimiques, un mécanisme réactionnel général a été proposé pour MGD1 (Figure 26) (Rocha *et al.*, 2016). La réaction enzymatique s'effectue selon un mécanisme de simple déplacement de type S_N2 *via* un état de transition des ions oxocarbenium assisté par une base catalytique (H155), comme décrit dans le paragraphe II 3)b). En effet, il est proposé que l'histidine 155 soit la base catalytique qui déprotonne le groupe OH nucléophile de l'accepteur DAG.

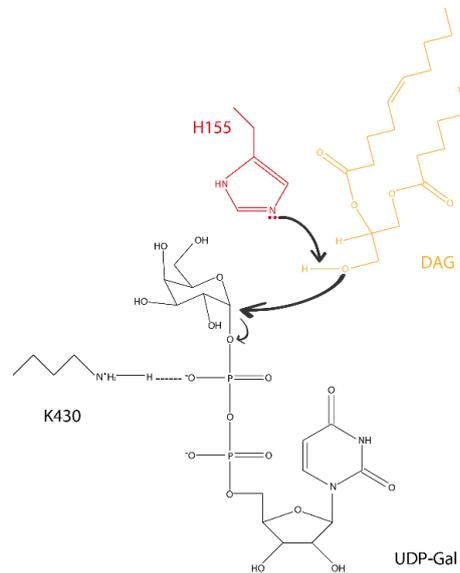


Figure 26 : Mécanisme réactionnel de type S_N2 proposé pour MGD1 (Rocha *et al.*, 2016).

Lors de la réaction catalysée par MGD1 (Figure 23), la configuration anomérique du sucre est inversée (passage de la configuration α du galactose lié à l'UDP à la configuration β dans le produit MGDG). MGD1 est donc une enzyme dite « invertant » (cf II 3 b)). Un mécanisme réactionnel de type S_N2 a été proposé pour MGD1 sur la base des résultats de la structure et d'expériences de mutagenèse dirigée. Il a permis de proposer le résidu Histidine 155 comme base catalytique putative (Rocha *et al.*, 2016).

e) Propriétés de liaison à la membrane

Des études basées sur les monocouches de Langmuir ont permis d'étudier les capacités de liaisons à la membrane de MGD1 afin de comparer les effets possibles de différentes compositions lipidiques (Sarkis *et al.*, 2014). Ces études ont mis en évidence le rôle positif joué par les lipides anioniques (AP et PG) sur la liaison de MGD1 à la membrane par des interactions électrostatiques (supposées). De manière inattendue, MGD1 a montré une haute affinité pour son produit, le MGDG, qui permet de maintenir l'enzyme associée à la membrane (le substrat de MGD1, DAG, étant très peu présent dans l'IEM). Le DGDG, quant à lui, a pour effet d'exclure MGD1 des membranes. Par ces résultats, un système de rétrocontrôle par le DGDG a été proposé (Figure 27).

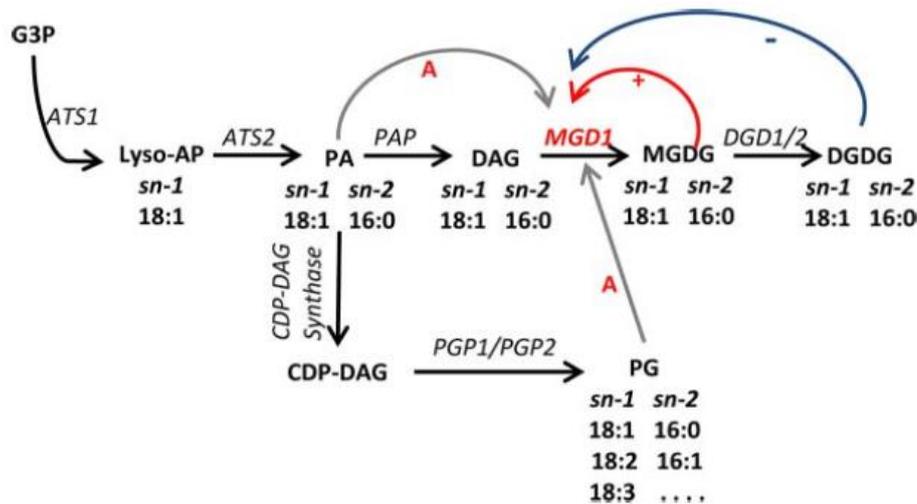


Figure 27 : Synthèse des lipides/glycolipides dans les plantes. L'AP et le PG correspondent aux activateurs (A) de MGD1. MGDG semble maintenir MGD1 liée à la membrane (+). Le DGDG semble exclure la MGD1 de la membrane (-) (Sarkis *et al.*, 2014).

L'effet positif du MGDG sur MGD1 permettrait d'éviter au DAG, le substrat de MGD1, de s'accumuler dans les membranes du chloroplaste.

Les effets de ces galactolipides sur la liaison de MGD1 à la membrane suggèrent également le rôle des lipides sur la localisation de MGD1 dans des microdomaines spécifiques. En effet, des études utilisant la microscopie à force atomique (AFM) ont permis d'imager l'insertion de MGD1 dans la membrane. Avec l'injection de MGD1 sous une monocouche de MGDG, des structures allongées et réticulées ont été observées, correspondant à une interaction protéine-protéine entre les molécules de MGD1. Ce phénomène suggère que MGD1 tend à maximiser la surface de contact avec le MGDG, tout en gardant une continuité protéine-protéine. Les nanostructures lipoprotéiques réticulées MGD1 / MGDG qui en résultent pourraient donc servir de plateforme optimisée pour produire du MGDG à grande vitesse, et pourraient contribuer, du fait de leur forme allongée, à l'échafaudage de prothylakoïdes issus de l'IEM.

f) Rôle des lipides anioniques

Des études ont montré que MGD1 a besoin de lipides anioniques tels que le PG et/ou l'AP pour être active (Dubots *et al.* 2010; Rocha *et al.* 2013). Pour rappel, l'AP est un phospholipide au carrefour de nombreuses voies du métabolisme des glycérolipides. Il est à

la fois précurseur de la synthèse de tous les glycérolipides et produit d'hydrolyse des phospholipides. Il constitue par ailleurs une molécule de signalisation fondamentale chez les plantes (Dubots *et al.*, 2011). Le PG est un phospholipide relativement abondant dans toutes les membranes des plastes, représentant 7 à 10% des lipides de la membrane interne de l'enveloppe avec une composition en AG différente. Il a été montré que MGD1 est activée allostériquement par l'AP mais le rôle de cette activation reste mal compris à ce jour. MGD1 est aussi activée, mais de façon non allostérique, par le PG. Des expériences ont mis en évidence que l'AP et le PG agissent sur le fonctionnement de MGD1 par des mécanismes différents. En effet, l'activité en présence d'AP et de PG est bien plus importante que la somme des activités obtenues séparément en présence soit de l'AP, soit du PG. Cet effet synergique suggère donc des sites de liaisons et des rôles différents pour l'AP et le PG sur l'enzyme (Dubots *et al.* 2010). Les résidus tryptophane 287 (W287) et proline 189 (P189), situés dans le domaine N-terminal, semblent jouer un rôle critique dans l'interaction de MGD1 avec le PG (Dubots *et al.* 2010; Rocha *et al.* 2016). En effet, l'importance de certains résidus pour l'activité de MGD1 a été mise en évidence par des expériences de mutagenèses dirigées (Botté *et al.*, 2005; Dubots *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2016). Une mutation du résidu H155, abolit totalement l'activité de l'enzyme. Une mutation des résidus P189 et W287 diminue drastiquement l'activité de l'enzyme en présence de PG.

Le domaine N-terminal interagissant avec la membrane (Botté *et al.*, 2005; Ha *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2016) et considérant l'abondance du PG dans l'enveloppe des plastes, une hypothèse met en avant que le PG contribuerait à ancrer MGD1 dans la membrane. Le rôle exact du PG sur l'augmentation de l'activité de MGD1 reste à ce jour encore non compris.

Objectifs du travail de thèse

Les résultats déjà obtenus au niveau de la structure de MGD1 (Rocha *et al.*, 2016), de la liaison de la protéine à la membrane (Rocha *et al.*, 2016; Sarkis *et al.*, 2014) et de la régulation de l'enzyme par l'AP et le PG (Dubots *et al.* 2010; Rocha *et al.* 2013) ont constitué la base de départ de mon travail.

Mon sujet de thèse a eu pour objectif de mieux appréhender le processus de biosynthèse des galactolipides en essayant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de régulation de l'activité de MGD1. Pour cela, l'étude s'est portée sur la protéine native MGD1 ainsi que deux de ces mutants (H155A et P189A). Le premier mutant concerne le résidu H155 proposé comme le résidu catalytique de MGD1, impliqué dans l'interaction avec le substrat accepteur. Le deuxième mutant concerne le résidu P189 identifié comme un résidu potentiel impliqué dans la liaison au PG et qui pourrait ainsi nous donner des indications sur le mécanisme d'activation de MGD1 par le PG.

Mon projet a combiné différentes approches, prenant en compte 3 axes principaux. Le premier axe a concerné la production des enzymes comprenant l'expression et la purification de MGD1 et de ses mutants. Le deuxième axe a visé à étudier l'activité de ces enzymes en présence d'effecteurs en développant une nouvelle technique de mesure d'activité enzymatique, plus rapide et ne nécessitant pas l'utilisation de la radioactivité. Le troisième axe a été centré sur l'étude des propriétés d'association de MGD1 et de ses mutants à des membranes modèles et à la mise en place d'un nouveau test d'activité à l'aide de la technique des monocouches de Langmuir. Cette troisième partie a été réalisée à l'Université de Lyon, en collaboration avec le Professeur Agnès Girard-Egrot de l'équipe GEMBAS à l'ICBMS. Elle a permis de mieux comprendre le rôle de l'interaction avec le PG sur l'activation de MGD1, d'une part, et de démontrer qu'il est possible de faire la distinction entre l'activité d'une protéine et ses capacités de liaison, d'autre part, grâce au développement d'un nouveau test d'activité en monocouches permettant, pour la première fois, une synthèse de lipides *in vitro* dans un système biomimétique. Ce test nous a permis de lever toute ambiguïté sur les raisons de l'inactivité du mutant H155A. Cet axe sera présenté sous forme de deux publications qui ont été rédigées pendant ma thèse.

MATERIELS ET METHODES

I. Expression des protéines recombinantes chez *Escherichia Coli*

1) Préparation des souches d'expression

a) Construction de l'ADN modifié

La séquence primaire de MGD1 de *Arabidopsis thaliana* possède un peptide transit du résidu 1 au résidu 106 en position N-terminale, suivi d'une courte séquence du résidu 107 au résidu 136, prédite comme étant désordonnée et non nécessaire à l'activité de l'enzyme (Dubots *et al.*, 2010). Les résidus 137 à 533 correspondent au domaine catalytique de l'enzyme (Figure 28).

La séquence codante débutant par l'acide aminé 137, pour la protéine recombinante atMGD1 est insérée dans le plasmide pET-29b (Novagen). Ce système va permettre de cloner et d'exprimer la protéine chez *E. coli*. L'utilisation de ce plasmide permet d'obtenir une protéine fusionnée avec l'étiquette C-terminale polyhistidine (His-Tag) qui permettra d'obtenir la purification de la protéine par chromatographie d'affinité (IMAC).

C'est cette partie de la protéine, fusionnée à une étiquette 6-Histidine en position C-terminale, qui va être exprimée sous forme recombinante dans la souche BL21 (DE3) d'*E. coli*.



Figure 28 : Construction de atMGD1Δ137.

b) Incorporation de l'ADN modifié dans les bactéries compétentes XL1

Afin d'amplifier le plasmide, les bactéries compétentes XL1 sont utilisées. L'ADN modifié est incorporé dans les bactéries compétentes par choc thermique (45 secondes à 42°C, puis 2 minutes dans la glace). Elles sont sélectionnées après étalement sur milieu LB (*lysogeny broth*) gélosé complémenté en Kanamycine (50 µg/mL) et incubation à 37°C sur la nuit.

c) Extraction de l'ADN plasmidique

A l'aide d'un kit de mini-préparation (QIAGEN), l'ADN plasmidique est extrait afin de pouvoir être utilisé pour être incorporé dans la souche BL21 (DE3) d'*E. Coli* (Novagen).

d) Expression de la protéine sous forme recombinante dans la souche BL21 (DE3) d'*E. Coli*

L'intérêt de la souche bactérienne BL21 (DE3) (Novagen) est qu'elle contient le gène codant pour l'ARN polymérase T7, qui est sous le contrôle du promoteur *LacUV5*, inductible par l'IPTG (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*). L'ADN modifié est incorporé dans les cellules BL21 par choc thermique (45 secondes à 42°C puis 2 minutes dans la glace) puis les cellules sont sélectionnées après étalement sur milieu LB gélosé, complémenté en Kanamycine (50 µg/mL), et incubation d'une nuit à 37°C.

2) Expression des protéines recombinantes (atMGD1Δ137, H155A, P189A, W287A, CaMGD1) chez *E. Coli*

Le protocole de production de MGD1 est le suivant. La pré-culture en milieu LB est supplémentée en kanamycine est réalisée à 37°C toute la nuit sous une agitation de 200 rpm (rotation par minutes), après inoculation à partir de la souche d'expression de la protéine recombinante ou de ces mutants. Un volume de 1 L de LB supplémenté en kanamycine est inoculé avec 35 mL de pré-culture. La croissance des bactéries est effectuée à 37°C, 180 rpm pendant 2 heures jusqu'à atteindre une densité optique (DO) à 600 nm située entre 0,6 et 0,8. Une fois la DO atteinte, l'ajout d'IPTG (concentration finale 0,25 mM) va permettre d'induire l'expression des protéines recombinantes par incubation à 30°C, à 180 rpm pendant 4 heures. Les cultures sont ensuite centrifugées à 7000 g pendant 15 minutes à 4°C, puis le culot est resuspendu et centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes à 4°C. Ce culot est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Les mutants de MGD1 et caMGD1 ont été exprimées de la même façon.

II. Purification des protéines recombinantes

1) Préparation des extraits cellulaires

Pour lyser les bactéries, le culot bactérien est resuspendu à 1g de culot / 5 mL de tampon de lyse (Tampon A : 25 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1M urée, 10 mM imidazole, 1mM DTT), auquel est ajouté une tablette d'inhibiteur de protéases de chez Roche / 50 mL de tampon de lyse (Ces inhibiteurs inhibent un large spectre de sérine, de cystéine et de métalloprotéases. En raison de la composition optimisée de ces comprimés, ils présentent d'excellents effets d'inhibition et conviennent bien à la protection des protéines isolées des tissus animaux, des plantes, des levures et des bactéries) et 3 µL de benzonase nucléase. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide d'un disrupteur de cellules (*Constant Cell disruption system*) en étant soumises à une forte pression de 1,8 kbar lors de leur passage dans une buse de petit diamètre. Une centrifugation à 45000 g pendant 40 minutes à 4°C est effectuée afin de récupérer les protéines solubles dans le surnageant. Le surnageant est ensuite filtré à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 0,2 µm avant d'être utilisé pour l'étape de purification.

2) Purification des protéines recombinantes

Le protocole de purification de MGD1 précédemment établi au laboratoire (Rocha *et al.*, 2013) permet d'obtenir une protéine pure et homogène dans des conditions favorables à la cristallisation. La fraction cellulaire soluble d'*E. Coli* obtenue après la lyse cellulaire contient la protéine recombinante MGD1-His₆.

La purification de cette protéine met en jeu deux étapes. La première est une chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (HisTrap) (GE Healthcare) connectée à un système FPLC (*fast protein liquid chromatography*) ÄKTA, de capacité de fixation de 1mL ou 5mL, basée sur la formation chelation entre les noyaux imidazole de l'étiquette (His)₆ de la protéine et les charges positives portées par les ions nickel de la colonne. L'élution de MGD1 se fait par application d'un gradient d'imidazole (Tampon B : 25 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 M urée, 500 mM imidazole, 1 mM DTT). Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont récupérées, concentrées et soumises à une seconde étape de chromatographie. Cette deuxième étape utilise la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) qui permet de séparer les molécules selon leur taille. La colonne utilisée (Superdex 200) de 24 mL permet de séparer

les protéines de 10 kDa à 600 kDa, MGD1 ayant un poids moléculaire de 44 kDa. Cette étape permet d'éliminer les protéines contaminantes et les éventuels agrégats protéiques afin d'obtenir MGD1 sous une forme suffisamment pure et homogène. Le tampon C utilisé pour cette étape est composé de 25 mM Bis-Tris propane pH 6,5, 150 mM NaCl, 5 % glycérol, 1 mM TCEP (*tris(2-carboxyethyl) phosphine*). La protéine peut être concentrée jusqu'à 10 mg/mL en utilisant un concentrateur (Vivaspin 30 MWCO). Cette forme tronquée de MGD1 peut être produite sous forme monomérique, soluble et active. Le même protocole d'expression et de purification a été utilisé pour produire les mutant H155A, P189A et W287A de MGD1, ainsi que pour CaMGD1.

III. Méthodes d'analyse des protéines

1) Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) et en conditions dénaturantes permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le SDS est un détergent dénaturant, chargeant les protéines négativement afin d'assurer leur migration dans le gel indépendamment de leur charge propre. Cette méthode permet d'analyser nos échantillons au fur et à mesure de la purification pour vérifier la présence et la pureté de notre protéine d'intérêt dans nos différentes fractions.

Les échantillons protéiques sont repris dans du tampon de charge Blue 5x (*Laemmli buffer*, 0,25 mM Tris-HCl pH 6,8, 50 % glycérol, 10 % SDS, 0,05 % bleu de Bromophénol, 0,25 mM DTT) et chauffés à 100°C pendant 5 minutes avant de les déposer sur gel. Le marqueur standard est le « *Precision Plus protein standards unstained* » de Bio-Rad.

Les protéines vont ensuite migrer sur gel de polyacrylamide. Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de concentration (Tris 1M) contenant 30 % (v/v) d'acrylamide à pH 6,8 et d'un gel de séparation contenant 10 % (v/v) d'acrylamide (Tris 1,5 M) à pH 8,8. L'électrophorèse est conduite à voltage constant (valeur en volt) dans du tampon de migration 1X (10 X : 30,2 g tris, 144 g glycine, 10g SDS). Les protéines chargées négativement, migrent dans un champ électrique à travers un maillage plus ou moins dense selon la quantité d'acrylamide et le degré de polymérisation. La distance qu'elle parcourt à travers le gel va

dépendre principalement de leur masse. A la fin de la migration, les gels sont colorés au bleu de Coomassie (*InstantBlue™*), prêt à l'emploi pour les gels de Polyacrylamide (Expédeon).

2) Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique non invasive qui permet de mesurer la taille et la distribution des molécules en suspension (MALVERN Instrument).

La DLS va permettre de vérifier la monodispersité de notre échantillon et ainsi de vérifier l'état d'agrégation de notre protéine.

Nous utilisons la DLS pour vérifier la qualité de notre protéine d'intérêt après les deux étapes de purification, et après concentration et stockage à -20°C. Si le pourcentage de polydispersité est inférieur à 20%, la protéine purifiée est alors qualifiée de monodisperse : elle n'a pas tendance à s'agréger et peut donc être utilisée pour des études de cristallographie. 5µL de notre protéine sont dilués dans 45 µL de tampon C et mis dans la cuve en quartz. Un pic unique est attendu pour MGD1, proche de 10 nm.

3) Mesure de l'activité enzymatique des protéines recombinantes

a) Tests d'activité par radioactivité

L'activité enzymatique de la protéine MGD1 est effectuée par mesure de l'incorporation de galactose marqué au carbone 14, provenant du substrat UDP-[¹⁴C] Gal, sur l'accepteur lipidique le diacylglycérol (DAG). Ces mesures sont réalisées dans des micelles mixtes détergent/lipides. La concentration de chaque lipide est exprimée en concentration de surface du lipide au niveau de la micelle mixte (% mol).

Le DAG et les différents lipides testés (AP / PG) sont ajoutés en solution chloroformique dans un tube à hémolyse en verre, puis séchés sous argon. Les lipides sont ensuite resolubilisés par ajout du milieu réactionnel composé du tampon 3X (75 mM Bis-Tris pH 6,5, 450 mM NaCl, 15 % glycérol, 3 mM TCEP) auquel est ajouté du détergent : 18 mM de CHAPS. La protéine est ensuite ajoutée au mélange à une concentration de 11 ng/µL. Les micelles mixtes sont formées par incubation 10 min à 20°C au bain de sonication (Figure 29) (Tableau 3).

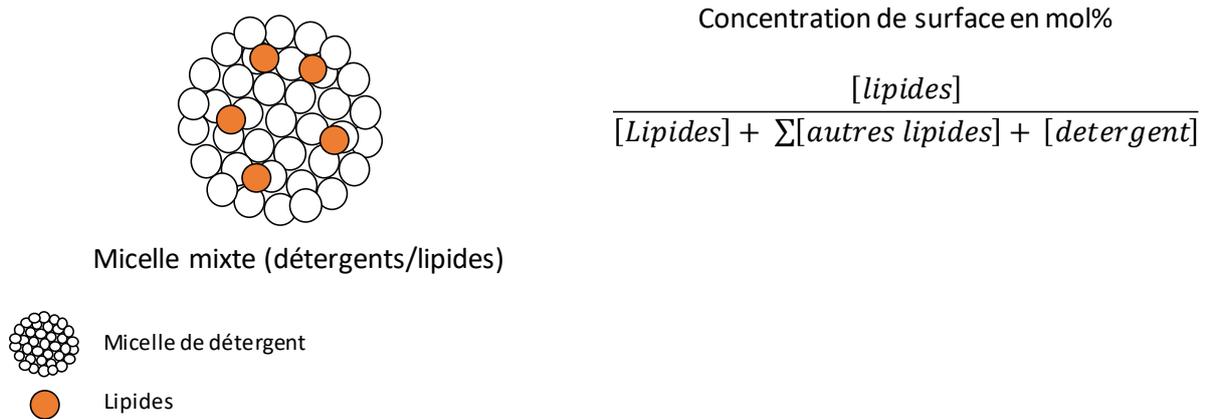


Figure 29 : Concentration de surface d'un lipide dans une micelle mixte. La concentration de surface d'un constituant amphiphile ou hydrophobe correspond au pourcentage de moles (mol%) de ce constituant parmi l'ensemble des amphiphiles du milieu : le détergent (CHAPS), le DAG et le lipide additionné (PG ou AP).

L'initiation de la réaction se fait par ajout de l'UDP-[¹⁴C] Gal (22,9 GBq.mol⁻¹). La réaction se déroule à température ambiante et est arrêtée à différents temps (5, 10, 15, 20 min) par l'ajout de 1,5 mL du mélange chloroforme/méthanol (1:2 (v/v)). Ensuite, 864 µL d'eau et 500 µL de chloroforme sont ajoutés dans chaque tube, qui est alors vortexé. Les solutions sont laissées à décanter jusqu'à l'obtention de deux phases bien distinctes. Les lipides sont ensuite extraits par la méthode de Bligh et Dyer (cf VI). La mesure de la radioactivité du MGDG marqué au ¹⁴C est effectuée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide, en présence de 5 mL de liquide scintillant ReadySafe (Beckman).

	Volume (µL)
DAG (1 mg/mL)	10
AP ou PG (1 mM) 1,5 mol%	4
Tampon 3x + CHAPS	12
H₂O	20
MGD1 (11 ng/µL)	2
UDP-Gal (700 µM) (22,9 GBq.mol⁻¹)	2,5
Total	36,5

Tableau 3 : Quantités utilisées pour les mesures d'activité de MGD1 en radioactivité.

b) Mesure d'activité par bioluminescence

Dans le but d'éviter d'utiliser la radioactivité et d'obtenir des mesures d'activité de protéines plus rapidement, nous avons développé dans le cadre de cette thèse une méthode de mesure d'activité de MGD1 basée sur le principe de la bioluminescence, utilisant la technique de l'UDP-Glo, kit commercial vendu par Promega. Le test UDP-Glo™ Glycosyltransférase est une méthode homogène d'addition de réactifs uniques pour détecter rapidement la formation d'UDP dans les réactions de glycosyltransférases. Après la réaction catalysée par la glycosyltransférase, un volume égal de réactif de détection de l'UDP est ajouté pour convertir simultanément le produit UDP en ATP et générer de la lumière par une réaction impliquant la luciférase. Le flux lumineux est proportionnel à la concentration en UDP de nM à 25 µM. L'avantage de ce test est que le dosage est rapide, simple et hautement sensible, des caractéristiques souhaitables et essentielles pour mesurer l'activité de différentes glycosyltransférases utilisant du sucre UDP couvrant la majorité des classes de glycosyltransférases. Par conséquent, le test de détection UDP utilise moins d'enzyme dans les réactions de glycosyltransférase. Le test UDP-Glo™ est effectué dans un seul puits d'une plaque multipuits et peut être utilisé pour détecter une activité glycosyltransférase en une réaction de seulement 5 µl (Figure 30).

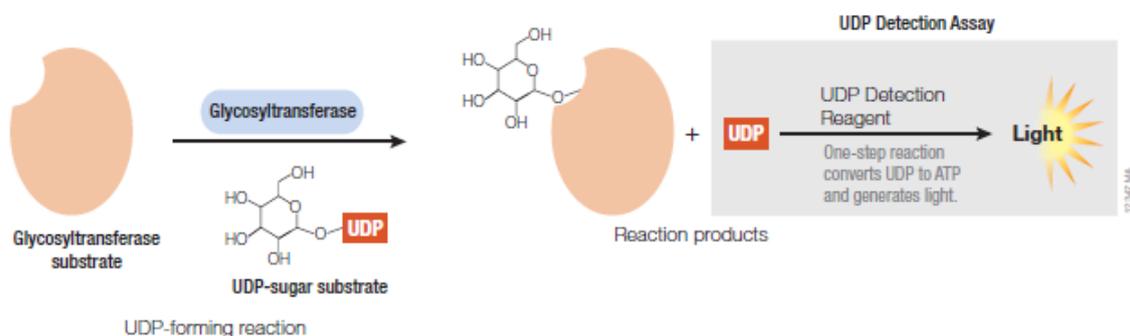


Figure 30 : Schéma du principe de la technique de bioluminescence (UDP-Glo de Promega).

Pour effectuer ces expériences, la technique de l'UDP-Glo a nécessité une optimisation pour pouvoir l'adapter à notre système micellaire. Nous nous sommes basés sur le protocole des tests d'activité par mesure de la radioactivité (a), nous permettant d'avoir des conditions similaires d'expériences et ainsi, de pouvoir comparer les résultats obtenus avec ces deux

techniques. L'accepteur DAG, l'activateur AP ou PG et l'enzyme sont ajoutés dans les tubes à hémolyse en verre où la réaction va s'effectuer dans les mêmes conditions que celles du Tableau 3. Les lipides sont séchés sous argon. Le milieu de réaction composé du tampon 3 X (75 mM Bis-Tris propane, 450 mM NaCl, 15 % glycérol, 3 mM de TCEP) supplémenté avec 18 mM de CHAPS est ajouté dans les tubes, suivi par l'ajout de l'enzyme et il y a ensuite sonication 10 minutes à 20°C. L'ajout d'UDP-Gal (700 μ M) dans les tubes à hémolyse va initier la réaction enzymatique. Cette dernière est arrêtée à différents temps en prélevant 25 μ L du milieu réactionnel, qui sont ajoutés à 25 μ L du réactif (*UDP detection reagent*, composé de 10 mL de *nucleotide detection buffer* dans de l'*ATP detection substrate* en poudre) préalablement rajouté dans les puits d'une microplaque (de chez Greiner bio-one). Après 1 heure d'attente à température ambiante, dans le noir, la révélation peut être effectuée par lecture de la luminescence grâce à l'appareil TECAN SPARK 10M.

Pour ces expériences de bioluminescence, la quantité d'enzyme recommandée par le fournisseur varie de 1 à 100 ng (pour rappel, on utilise 400 ng par essai dans le test radioactif). Dans le cas de MGD1, les quantités d'enzyme utilisées variaient de 1 à 5 ng. La gamme étalon d'UDP donne une réponse en luminescence linéaire sur une gamme de concentration allant de 0,02 à 0,8 μ M (Figure 31).

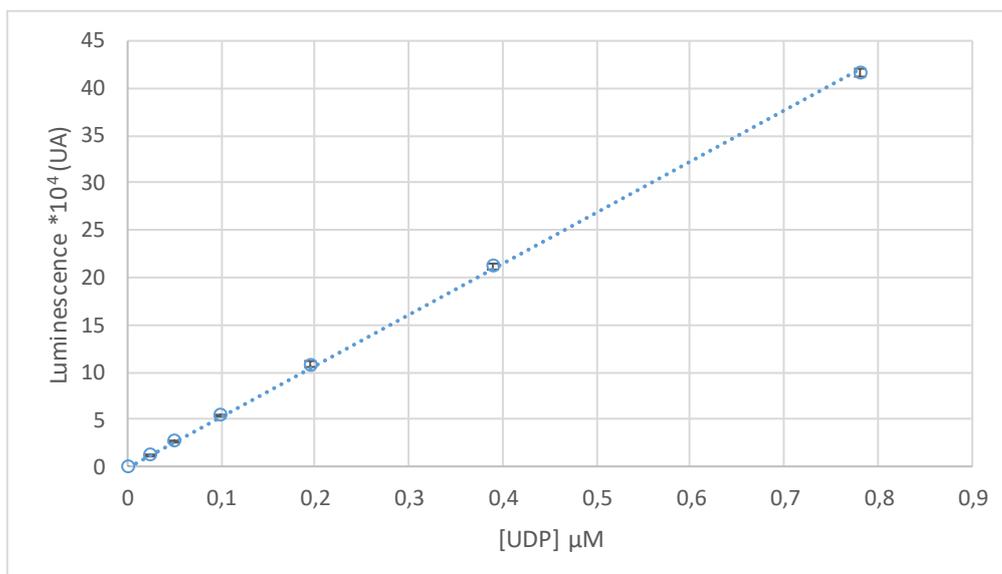


Figure 31 : Gamme étalon type d'UDP [μ M] obtenue avec le test de bioluminescence.

IV. Cristallisation des protéines

La cristallographie est la méthode expérimentale la plus utilisée pour déterminer la structure 3D des macromolécules biologiques à l'échelle atomique. L'avantage est de n'avoir aucune limite de taille et nécessite de ne disposer que d'un seul cristal. La structure 3D d'une protéine peut fournir d'importantes informations sur la fonction de la protéine et sur son mécanisme d'action. En effet, une protéine cristallisée garde la même structure et la même fonction que la protéine en solution.

Une protéine précipite naturellement de façon non-ordonnée, sous forme d'un précipité amorphe, or dans des conditions données de pH, température et selon la nature et la concentration en sels et en agents organiques, la protéine peut former un cristal. Il faut donc tester de nombreuses combinaisons de tampon, de pH et de température afin d'identifier les conditions requises permettant l'obtention d'un cristal, correspondant à un précipité ordonné (cristallin) avec la présence du minimum de contaminants. La concentration de la protéine est également un paramètre très important :

- si la concentration de la protéine est trop importante, la protéine précipitera ;
- si la concentration de la protéine est trop faible, la protéine ne cristallisera pas.

La deuxième étape consiste à tester la qualité des cristaux obtenus par la méthode de la diffraction aux rayons X.

La méthode de la goutte suspendue a été utilisée. Elle consiste à mettre dans les puits des plaques les solutions précipitantes (elles peuvent être composées de MgCl₂/PEG, par exemple). Sur des lamelles en verre, une goutte constituée du mélange de la protéine et de l'agent précipitant, en différents ratio, est déposée puis retournée au-dessus des puits. Au début, la concentration de la solution précipitante présente dans les puits est supérieure à celle de la goutte. L'équilibre de concentration va se mettre en place par diffusion de l'agent volatil de la goutte jusqu'à équilibre entre le réservoir et la goutte. Il y a alors concentration de la protéine dans la goutte, ce qui va diminuer la solubilité de la protéine et conduire à la cristallisation de cette dernière, si les conditions sont favorables.

V. Interactions membranaires

1) Monocouches de Langmuir

a) Formation des monocouches de Langmuir

La technique de Langmuir permet l'étude d'un film lipidique monomoléculaire formé à l'interface air/eau. Elle exploite les propriétés des molécules amphiphiles qui ont la capacité de s'auto-orienter à l'interface, entre la phase gaz et la phase liquide, ce qui va minimiser l'énergie libre de surface et conduire à la formation d'un film monomoléculaire insoluble (Figure 33). Dans notre étude, les molécules amphiphiles utilisées sont des lipides (DAG et/ou PG) solubilisés dans du chloroforme, solvant volatil et non-miscible à l'eau, et déposés à l'aide d'une seringue Hamilton à la surface d'un réservoir, appelé cuve de Langmuir, contenant du tampon. La solution lipidique va rapidement s'étaler à l'interface après dépôt, pour couvrir toute la surface disponible. Après évaporation du solvant (chloroforme), les molécules vont s'orienter de manière à former un film lipidique à l'interface air/tampon. Les têtes polaires hydrophiles sont immergées dans la sous-phase, et les chaînes alkyles hydrophobes pointent vers la phase gazeuse. Cette orientation spécifique est dictée par la nature amphiphile de ces molécules, aussi appelées surfactants ou tensioactifs, compte tenu de leur action sur la tension superficielle de l'eau. L'étape de compression à l'aide des barrières mobiles (5 mm/minutes) permet ensuite d'obtenir la pression de surface initiale désirée, notée π_i .

b) Pression de surface

La formation d'une monocouche amphiphile est liée aux propriétés thermodynamiques des interfaces air/liquide. La force linéaire qui agit sur les molécules à la surface est la tension superficielle ou tension de surface (γ). Cette tension de surface reste constante à température stable, mais diminue avec une augmentation de la température. Les liquides polaires comme l'eau présentent de fortes interactions intermoléculaires et ainsi, une tension de surface élevée (Figure 32). La tension de surface pour l'eau pure est de $72,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ à 20°C à pression atmosphérique. Cette valeur exceptionnellement élevée comparée à la plupart des autres liquides, fait de l'eau (et plus généralement des milieux aqueux), la sous-phase privilégiée pour les études en monocouches.

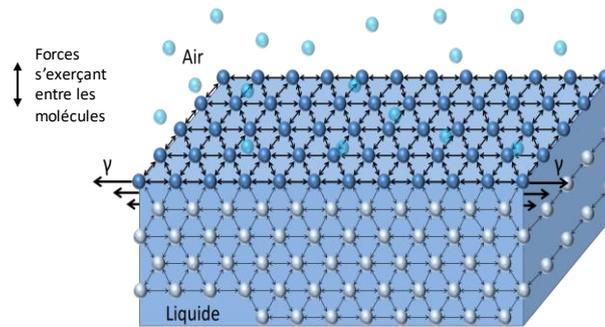


Figure 32 : Schéma représentant la tension de surface à l'interface air-eau.

La tension de surface est la conséquence de l'attraction des molécules d'eau à l'interface, qui sera diminuée par l'accumulation de molécules amphiphiles à l'interface air/liquide. En effet, la création d'interactions entre le groupe polaire hydrophile et les molécules d'eau à la surface, va réduire la tension de surface γ . Quand l'aire de la surface disponible pour le film interfacial est grande et que la quantité de surfactants est suffisamment faible pour limiter les interactions entre molécules amphiphiles adjacentes, la présence de molécules à l'interface n'a que peu d'effet sur la tension de surface du liquide. Si l'aire disponible pour la monocouche diminue (par compression à l'aide de barrières mobiles par exemple – Figure 33), la distance entre les molécules diminue et la valeur de la tension de surface est abaissée. Les molécules amphiphiles (principalement *via* leurs chaînes hydrocarbonées) commencent à interagir et exercent entre elles une force répulsive. La force exercée par le film par unité de longueur, correspondant à un analogue en 2-dimension d'une pression, est appelée pression de surface (π). Elle est égale à la diminution de la tension de surface du liquide pur (γ_0) en présence du film interfacial (γ) et est définie par la relation :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

γ_0 : tension superficielle de l'eau pure (72,8 mN.m⁻¹ à 20°C) ou du liquide pur

γ : tension de surface en présence de molécules à l'interface

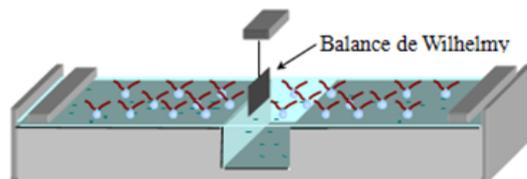
Il est possible de faire varier la pression de surface à l'aide de barrières mobiles situées à chaque extrémité de la cuve : l'avancement des barrières comprime et réduit la surface disponible, les lipides se rassemblent et s'organisent à l'interface (Figure 33). Au cours de la compression, la pression de surface augmente.

La méthode de Wilhelmy (Figure 34) est la méthode la plus fréquemment utilisée pour mesurer les tensions superficielles (γ) et en déduire la pression de surface π (c'est celle

employée au laboratoire à Lyon). Cette méthode est établie par la mesure absolue de la force causée par la tension de surface sur une lame partiellement immergée dans la sous-phase et accrochée à une électrobalance. Cette lame est usuellement constituée de platine ou de papier filtre type Whatman. La variation due à la diminution de la tension de surface (γ) est ensuite convertie en pression de surface π . Les systèmes commerciaux actuels donnent une précision de l'ordre de 10^{-4} mN.m⁻¹.

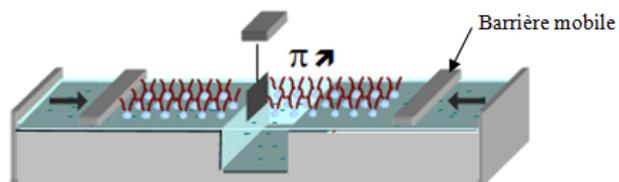
1 - Dépôt des molécules amphiphiles à la surface du tampon:

--> formation d'un film monomoléculaire à l'état gazeux



2 - Compression du film interfacial (avancées des barrières mobiles):

--> les molécules s'organisent à la surface de l'eau pour former un film plus ou moins condensé



3 - En fin de compression : film monomoléculaire à l'état condensé

--> les molécules forment un film parfaitement organisé à la surface de l'eau

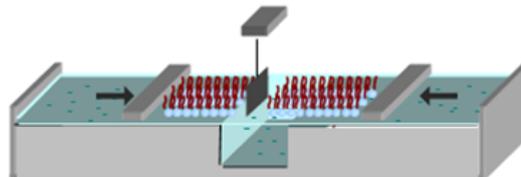


Figure 33 : Principe de la formation de la monocouche de Langmuir (Figure adaptée de la Thèse du Pr. Agnès Girard-Egrot).

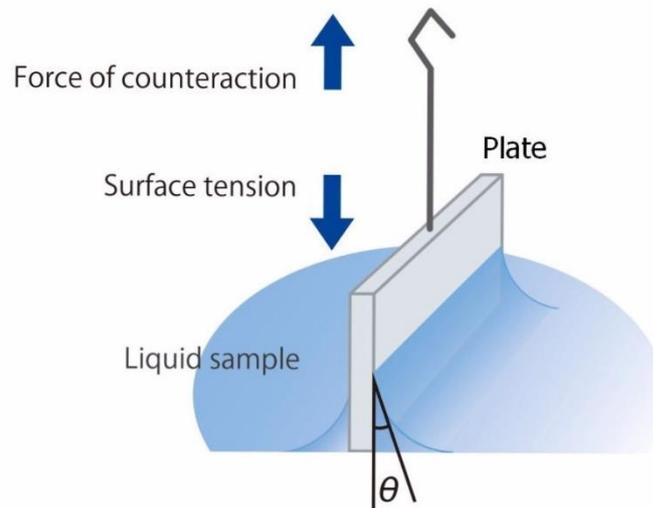


Figure 34 : Méthode de mesure de la tension de surface par la lame de Wilhelmy. Cette méthode consiste à mesurer le poids de la lame de Wilhelmy, accrochée à une électrobalance, qui varie en fonction de la force de la tension de surface du milieu dans lequel elle est partiellement immergée (Schéma © Kyowa Interface Science).

c) Isothermes de compression : $\pi = f(A)$

La compression du film lipidique est suivie par mesure de la pression de surface, ce qui va permettre de tracer une isotherme caractéristique du mélange utilisé à une température donnée. Cette pression exercée par les molécules est liée à l'aire moléculaire moyenne (\AA^2) occupée à chaque instant par une molécule à la surface du tampon. Elle dépend de la taille de la tête polaire et de l'encombrement des chaînes hydrophobes. Nous pouvons obtenir une isotherme qui reflète l'état d'organisation des molécules pendant leur compression. Pour chaque mélange, une isotherme a été enregistrée de façon systématique.

La Figure 35 montre l'isotherme type d'un lipide.

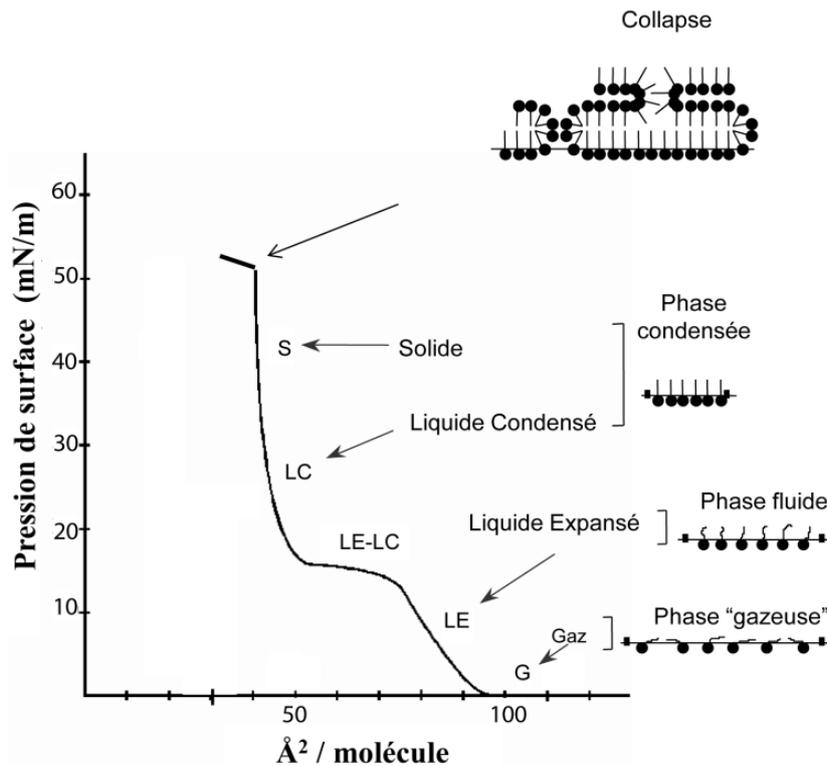


Figure 35 : Isotherme type d'une monocouche de lipides indiquant les différents états d'organisation dans le film interfacial. Source : Thèse d'Agnès Girard-Egrot.

Au cours de la compression de la monocouche à l'aide des barrières permettant de réduire la surface occupée par le film lipidique, les lipides adoptent différents états passant de la phase gazeuse à la phase liquide expansée. Ces phases correspondent à différents degrés d'organisation et de liberté des molécules, essentiellement influencés par les conformations adoptées par des chaînes aliphatiques.

- L'état de type « gazeux » est visible en début de compression, pour des aires moléculaires moyennes importantes, lorsque dans la monocouche, la répartition minimise les interactions entre molécules. La pression de surface mesurée est alors proche de zéro.
- L'état dit « liquide-expansé » ou fluide : les têtes hydrophiles sont organisées en réseau 2D parallèlement à la surface et les chaînes hydrophobes se redressent et commencent à interagir entre elles tout en conservant leur flexibilité.
- Le plateau qui suit la phase liquide-expansé sur l'isotherme d'une monocouche de lipides correspond à une transition de phase entre la phase liquide expansée (LE) et la

phase liquide condensée (LC). Cette transition est dépendante de la température de la sous-phase et de la température de fusion du lipide.

- L'état dit « liquide-condensé » est caractérisé par un arrangement compact des têtes polaires qui se rapprochent et un agencement ordonné des queues hydrophobes. Sous l'effet de la réduction des distances intermoléculaires, les interactions entre les chaînes hydrocarbonées se renforcent, ce qui diminue leur fluidité. Les chaînes forment alors un réseau moléculaire compact de forte rigidité.

La compression de la monocouche au-delà d'un certain seuil entraîne le « collapse » du film interfacial. La zone de collapse correspondant à la rupture de la monocouche, est atteinte lorsque la pression exercée en fonction de l'aire moléculaire moyenne est trop élevée.

La température et les conditions physico-chimiques influencent grandement la forme de l'isotherme et le type de phases formées à la surface de l'eau. La nature du lipide utilisé, et notamment sa température de fusion, influence le nombre de phases observées : dans le cas des acides gras à longues chaînes, l'isotherme montre que la monocouche d'acides gras peut passer directement de l'état G à l'état LC ; dans le cas de phospholipides, la longueur des chaînes hydrocarbonées peut influencer la largeur du plateau et la pression de la transition de phases LE/LC ; la présence de double liaison diminue la formation de la phase liquide condensée.

d) Protocole

Dans notre étude, le système utilisé est une cuve (*Biolin Scientific Finlande*) en Téflon de 80 mL présentant une surface de 119 cm². La seringue utilisée pour le dépôt des molécules à l'interface air/tampon provient de chez Hamilton®. Des précautions particulières sont nécessaires pour la manipulation des lipides. La verrerie utilisée, ainsi que la cuve et les barrières mobiles sont rincées à l'eau ultrapure (18,2 mΩ.cm), puis une fois à l'éthanol, une fois au dichlorométhane, à nouveau à l'éthanol et à l'eau pure. Ce nettoyage est nécessaire pour garantir la propreté du matériel utilisé. Une fois nettoyée, la cuve est remplie de 80 mL de tampon C composé de 25 mM Bis-Tris, pH 6,5, 150 mM NaCl, 5% Glycérol et 1 mM TCEP, filtré à 22 µm. La lame de Wilhelmy stockée dans un mélange éthanol/eau (1 :1) est ensuite rincée à l'eau et installée sur la cuve de Langmuir. Les molécules sont déposées à partir d'une solution chloroformique de lipides concentrée à 1 mM. Après évaporation du solvant, la

monocouche est comprimée à une vitesse de compression de $0,045 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécules}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ jusqu'à la pression de surface désirée, π_i .

A chaque expérience, les isothermes sont enregistrées. Tous les lipides ou les mélanges lipidiques utilisés sont en phase fluide (LE).

2) Etude de l'interaction protéine-monocouche

Afin d'étudier les interactions de la protéine avec différentes monocouches de Langmuir formées, il est nécessaire d'injecter la protéine en sous-phase et d'étudier son interaction par la mesure de paramètres physicochimiques (Boisselier *et al.*, 2013; Derde *et al.*, 2015; Sarkis *et al.*, 2014). Dès l'ajout de MGD1 en sous-phase, on observe une augmentation instantanée de la pression de surface π en fonction du temps (Figure 36-A), cinétique d'interaction nous permettant de déterminer deux données principales :

- la constante de vitesse d'association k (s^{-1}) de la protéine avec la monocouche lipidique (*rate of binding*) ;
- la variation de pression $\Delta\pi$, correspondant à la différence entre la valeur π_{finale} à l'équilibre π_e et π_{initiale} ; cette valeur nous renseigne sur la capacité de la protéine à interagir avec la monocouche, c'est-à-dire sur sa capacité d'interaction avec les lipides membranaires.

a) Détermination de la constante de vitesse d'association (k)

Les courbes de variation de pression de surface en fonction du temps enregistrées durant l'interaction de la protéine sur le film monomoléculaire de lipides peuvent être ajustées en utilisant l'équation exponentielle étirée¹ adaptée à la mesure des pressions de surface par (Pitcher *et al.*, 2002) :

$$\pi_t = \pi_e - \pi_i e^{-(kt)^\beta} \quad (1)$$

π_t : pression de surface de la monocouche au temps t
 k : constante de vitesse d'association

¹ Généralisation de la fonction exponentielle avec un paramètre supplémentaire, l'exposant d'étirement β .

t : temps

β : exposant d'étirement fixé à une valeur de départ de 0,001 pour optimiser l'ajustement des isothermes (Calvez *et al.*, 2011; Pitcher *et al.*, 2002)

Cette équation permet de déterminer le paramètre k correspondant à une constante de vitesse d'association. Cette constante de pseudo-ordre 1 est exprimée en s^{-1} : en effet, dans ce modèle, on considère comme infini le nombre de site potentiel d'interaction de la protéine sur la monocouche. La vitesse d'interaction étant dans ce cas limitée par la diffusion, elle dépend uniquement de la concentration de la protéine injectée en sous-phase. Plus cette valeur est élevée, plus la protéine s'insère rapidement dans la monocouche.

Pour obtenir la valeur de k , la courbe de la cinétique d'interaction, pour chaque expérience, a été ajustée en utilisant l'équation de Pitcher (1).

b) Détermination de la pression maximale d'insertion, de la synergie d'interaction et du différentiel $d\pi_0$

L'étude de l'interaction d'une biomolécule avec une monocouche comprimée à différentes pressions initiales (π_i) permet de déterminer i) la pression maximale d'insertion (MIP pour *maximal insertion pressure*) de la molécule qui reflète la capacité d'interaction de cette dernière avec la monocouche, et ii) l'effet de la compression des lipides sur ses capacités de pénétration dans la monocouche (Boisselier *et al.*, 2012; Calvez *et al.*, 2011). Les valeurs maximales de $\Delta\pi$ obtenues juste après injection de MGD1 ont été reportées en fonction des différentes pressions initiales π_i . Comme montré dans la Figure 36-B, plus la pression initiale (π_i) est élevée, plus l'insertion de MGD1 dans la monocouche ($\Delta\pi$) diminue. Cette droite de pente négative est classiquement obtenue lors de l'étude de l'interaction d'une molécule avec les monocouches de Langmuir. Elle traduit la diminution des capacités d'interaction de la molécule en fonction de l'état initial d'organisation des lipides.

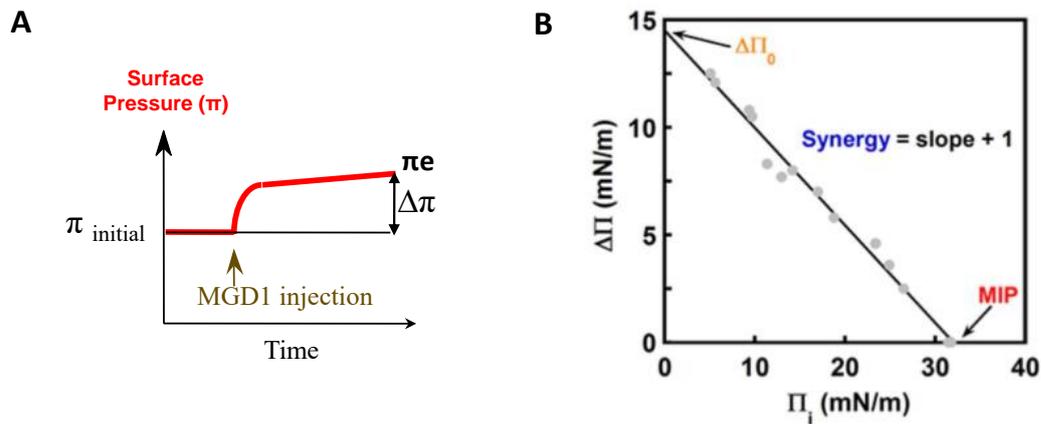


Figure 36 : (A) Cinétique d'interaction montrant la variation de la pression de surface (π) en fonction du temps permettant de mesurer la variation de pression $\Delta\pi$. (B) Droite de la variation de la pression de surface ($\Delta\pi$) en fonction de la pression initiale (π_i). En procédant à une extrapolation linéaire, on détermine à $\Delta\pi = 0$, la pression maximale d'insertion (MIP), et à $\pi_i = 0$, la variation de pression de surface pour une monocouche non comprimée ($\Delta\pi_0$). La mesure de la pente de la droite permet de déterminer la valeur du facteur synergique ($a = \text{pente} + 1$).

De cette droite $\Delta\pi = f(\pi_i)$, trois données principales sont extraites :

- la pression maximale d'insertion en $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, (MIP pour *maximal insertion pressure*) qui correspond à l'extrapolation de la valeur de π_i sur l'axe des abscisses. La MIP reflète la capacité d'interaction de la protéine avec une monocouche donnée. Si cette pression maximale d'insertion est proche de la pression latérale estimée des membranes biologiques de 30-35 mN/m (Marsh, 1996), on admet que l'interaction entre la molécule étudiée et le lipide est significative. La molécule injectée présente une capacité de pénétration suffisante pour s'insérer entre les lipides formant le film monomoléculaire fortement comprimé ;
- la synergie d'interaction (a) qui correspond au calcul de la pente à laquelle il faut rajouter +1 : $a = \text{pente} + 1$ (Boisselier *et al.*, 2012; Calvez *et al.*, 2011). Il traduit l'effet de la compression des lipides sur les capacités d'interaction de la molécule avec la monocouche :
 - si $a > 0$, l'interaction protéine / lipides est favorable ;
 - si $a < 0$, l'interaction n'est pas favorable (il y a alors répulsion de la molécule en fonction de la compacité de la monocouche) ;

- si $a = 0$, aucune interaction particulière n'intervient entre la molécule et les lipides. La diminution de la capacité d'interaction de la molécule est seulement liée à la compression physique des lipides.

Comme montré dans la Figure 37, si la synergie d'interaction est positive, la pression extrapolée induisant une variation de pression ($\Delta\pi$) nulle est appelée MIP. Dans le cas où la synergie d'interaction est négative, on peut utiliser le terme de pression d'exclusion au lieu de MIP.

- le paramètre différentiel $d\pi_0$ est calculé selon l'équation (Nasir *et al.*, 2017) :
 $d\pi_0 = \Delta\pi_0 - \pi_e$. La variation de pression $\Delta\pi_0$ correspond à la valeur de l'ordonnée à l'origine de la droite $\Delta\pi$ en fonction de π_i (Figure 36-B) ; cette valeur reflète les capacités d'interaction de la protéine dans une monocouche non comprimée de lipides. La valeur de π_e correspond à l'augmentation de la pression de surface à l'équilibre en l'absence de lipides, de la protéine seule à l'interface. $d\pi_0$ permet ainsi d'évaluer l'influence de la présence de lipides non comprimés sur l'adsorption interfaciale des protéines à pression de surface nulle (interface non comprimée). Quand $d\pi_0 > 0$, il y a un effet attractif des lipides sur l'absorption de la molécule, si $d\pi_0 < 0$, il y a un effet répulsif des lipides sur la molécule insérée dans la monocouche (Nasir *et al.*, 2017).

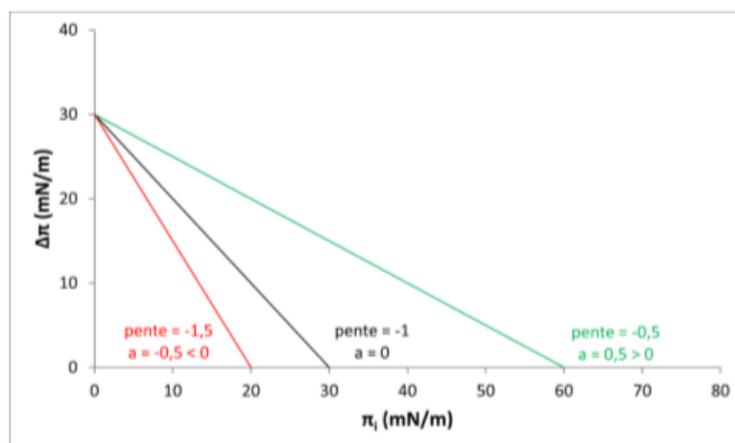


Figure 37 : Droites de la variation de pression de surface ($\Delta\pi$) en fonction de la pression initiale (π_i) permettant de mettre en évidence les différents cas de synergie. En verte, la droite est représentative d'une interaction protéine/lipide favorable. Dans ce cas, la valeur à laquelle la droite coupe l'axe des abscisses correspond à une pression maximale d'insertion MIP. En rouge, la droite représente le cas pour lequel il y a une répulsion entre la protéine et les lipides. Dans ce cas pour la valeur à laquelle la droite coupe l'axe des abscisses on peut parler d'une pression d'exclusion. En noire, les conditions pour l'interaction ne sont ni favorables ni défavorables, la synergie est nulle.

Les trois paramètres, MIP, $d\pi_0$ et a , peuvent maintenant être calculés à partir du logiciel « *Binding Parameters Calculator* » développé par le Pr. Salesse et le Dr. Boisselier de l'Université Laval. Ce gratuiciel est disponible sur le site internet du CHU de Quebec. L'incertitude est calculée à partir de la covariance des données expérimentales sur leur régression linéaire (Calvez *et al.*, 2009). Ces valeurs d'incertitudes sont calculées automatiquement à l'aide du logiciel suscité, avec un intervalle de confiance de 95%.

c) Protocole

Les mêmes précautions, que celles vues précédemment, sont nécessaires pour la manipulation des lipides. Le principe de l'étude de l'interaction MGD1/lipides à l'aide d'une monocouche de Langmuir est le suivant (Figure 33) : après installation du système, les lipides (DAG ou PG ou mélange DAG-PG en différents ratio) sont déposés goutte à goutte à l'interface air/tampon à l'aide d'une microseringue en verre préalablement rincée au chloroforme. La quantité déposée est suffisamment faible pour ne pas entraîner d'augmentation de la pression de surface π qui reste nulle (inférieure au bruit de fond de la balance de Wilhelmy). Après 20 minutes, lorsque les lipides se sont répartis en surface et que le chloroforme s'est évaporé, les lipides sont comprimés jusqu'à la pression initiale désirée π_i ($\pi_i = 7,5, 10, 15, 20, 23$ ou 25 mN/m). Après stabilisation de la pression (15 min), les barrières sont mises en pause et MGD1 est injectée dans la sous-phase, au travers de la monocouche préalablement formée, à l'aide d'une microseringue (Hamilton[®]), proche de l'agitateur magnétique.

Le volume de MGD1 injectée dépend de la concentration molaire souhaitée. Nous travaillons à une concentration molaire de 13 nM (concentration de la protéine qui sature l'interface lipidique en évitant l'agrégation de la protéine) (Sarkis *et al.*, 2014).

3) Technique du transfert Langmuir-Blodgett

La technique du transfert de Langmuir-Blodgett (LB) a été utilisée pour préparer les échantillons étudiés par microscopie à force atomique (AFM pour *atomic force microscopy*).

La même cuve KSV 2000 Langmuir-Blodgett (système à trois compartiments, KSV NIMA *Biolin Scientific Finlande*) avec un système de compression symétrique a été utilisée. Pour cela, après étude de l'interaction de la protéine avec la monocouche et stabilisation de la pression

superficielle, le film de Langmuir a été transféré sur des plaques de mica fraîchement clivées. Le clivage d'un mica s'effectue à l'aide de scotch. Des mouvements successifs et rapides permettent d'éliminer les feuilletts du mica, permettant d'obtenir facilement une surface plane et propre à l'échelle atomique par ce simple clivage. A une pression de surface constante de 15 mN.m^{-1} , le transfert s'effectue de manière verticale à la vitesse de 1 mm / min , à travers l'interface lipide / tampon.

L'efficacité du transfert du film de Langmuir sur le substrat est donnée par le taux de transfert (τ), défini comme le rapport de la diminution de l'aire de la monocouche à l'interface, A_d , sur l'aire de substrat immergé A_S : $\tau = \frac{A_d}{A_S}$

Quand la diminution de l'aire à l'interface est égale à l'aire du substrat immergé, le taux de transfert (τ) est égal à 1 ; le transfert est idéal. Toute la surface immergée est recouverte de monocouche. Dès que le taux de transfert est inférieur à 1, le transfert sur le substrat est incomplet et/ou l'organisation des molécules dans le film LB varie par rapport à celle du film de Langmuir. Ce taux de transfert a été suivi pour chaque expérience réalisée.

4) Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique est un type de microscopie à sonde locale, de très haute résolution, permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon, en se basant sur l'interaction entre cet échantillon et une pointe montée sur un micro-levier (ou cantilever). Les différences de hauteur (en z) de l'échantillon sont suivies par déflexion du micro-levier qui entraîne le déplacement d'un faisceau laser, capté par un photo-détecteur qui corrige alors la hauteur de la pointe par un système d'asservissement (Figure 38-A). La variation observée sur le photo-détecteur est alors convertie en image topologique reflétant directement les différences de hauteur grâce à une échelle de niveau de couleur. La force d'interaction pointe-surface se déduit de la déviation verticale par la loi de Hooke :

$$F = k d$$

k : raideur du levier

d : déflexion verticale

Cette loi permet d'évaluer le comportement des solides soumis à une déformation de faible amplitude. C'est une loi élastique linéaire. L'utilisation de leviers avec des constantes de

raideurs variées permet d'adapter la sonde au type d'échantillon exploré. Il existe plusieurs modes d'utilisation de l'AFM (Figure 38-B).

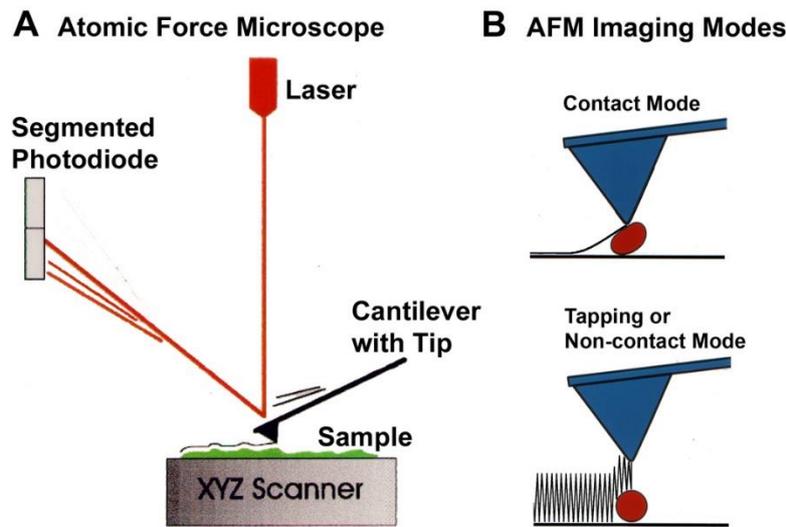


Figure 38 : (A) Principe de la microscopie à force atomique (B) Les différents modes de l'AFM (Source : Canadian Centre for Electron Microscopy CCEM).

Dans notre étude, les images AFM des films LB ont été réalisées en mode « *tapping* » (Figure 38-B) à l'aide d'un microscope à force atomique Solver PRO atomic force microscope (NT-MDT) dans des conditions ambiantes avec une surface de balayage de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Les images topographiques ont été acquises en utilisant des pointes de nitrure de silicium sur des cantilevers intégrés avec une constante de rappel nominale de 1,45-15,1 N / m et une fréquence comprise entre 87 et 230 kHz. Des images représentatives ont été obtenues à partir de ≥ 2 échantillons préparés à des jours différents et à partir de ≥ 3 zones macroscopiquement séparées sur chaque échantillon.

5) Tests d'activité en monocouche

Au cours de ma thèse, j'ai développé un test d'activité en monocouche permettant de faire la distinction entre les capacités de liaison de la protéine et l'acte catalytique. Cette distinction permettrait de mieux comprendre les raisons de la perte d'activité d'une protéine enzymatique : la protéine est-elle moins active car elle ne se lie plus à la membrane, où est-ce dû à son acte catalytique ?

Pour réaliser ces expériences, la cuve en téflon utilisée (« fait maison ») a un volume de 25 mL et une surface de 49 cm². Toutes les expériences ont été réalisées à 20° C. Les mêmes précautions sont à prendre que celles expliquées au paragraphe 2). La cuve est remplie avec le tampon C (Bis-Tris propane 25 mM, NaCl 150 mM, TCEP 1 mM, Glycérol à 5% ; pH 6,5). La technique consiste à déposer, à l'aide d'une microsiringue (Hamilton®) 3-4 µL de la solution lipidique solubilisée dans le chloroforme (DAG-PG 1 : 3 mol / mol) à l'interface air / tampon. Après 15 minutes de stabilisation et d'évaporation du solvant, la monocouche est comprimée à la pression superficielle initiale souhaitée, ici $\pi_i=15 \text{ mN.m}^{-1}$, par les deux barrières mobiles. Après stabilisation de la monocouche, la protéine est injectée dans la solution sous-phasique à une concentration finale de 4 nM à pression de surface constante. L'injection provoque le recul des barrières et la variation de l'aire. Après stabilisation, la surface est maintenue constante en arrêtant le mouvement des barrières mobiles, puis l'UDP-Gal est injecté sous la surface à une concentration finale de 0,5 mM. Cette injection déclenche l'augmentation de la pression de surface π pour atteindre la pression de surface à l'équilibre (π_e), indiquant la fin de l'expérience. Après stabilisation de la pression de surface, la monocouche est collectée pour être analysée par spectrométrie de masse afin de détecter la présence de MGDG. Les changements de pression de surface induits par l'interaction des protéines avec la monocouche ont été enregistrés en continu, en fonction du temps, contrôlé par le logiciel KSV NIMA (*Biolin Scientific*, Finlande).

VI. Extraction lipidique selon la méthode de Bligh et Dyer

La méthode de Bligh et Dyer (Bligh & Dyer, 1959) est utilisée pour l'extraction des lipides afin d'extraire les lipides totaux de l'échantillon aqueux. L'extraction des lipides se fait dans des ampoules à décanter. Chaque échantillon est prélevé et le volume est complété avec de l'eau jusqu'à un volume final de l'échantillon aqueux de 22,5 mL. 25 mL de chloroforme et 25 mL de méthanol sont ajoutés à l'ampoule. Le tout est mélangé sous argon et les deux phases sont laissées à décanter jusqu'à la visualisation de deux phases distinctes. La phase chloroformique inférieure contenant les lipides est ensuite récupérée et séchée sous argon. Le tube contenant les lipides séchés est ensuite repris avec 25 mL de chloroforme, 22,5 mL d'eau et 25 mL de méthanol et le tout est mis dans l'ampoule à décanter pour une deuxième

extraction. La même extraction est réalisée et après évaporation à sec sous argon, les lipides sont conservés à -20 ° C avant utilisation.

VII. Spectrométrie de masse

La méthode analytique utilisée est LC-MS/MS (*Liquid chromatography-mass spectrometry*). Elle consiste à séparer les molécules en utilisant la chromatographie liquide haute performance (HPLC). Ces molécules sont ensuite ionisées par une source d'ionisation par électrospray (ESI) avec très peu d'ionisation. Ces ions sont ensuite injectés dans la MS / MS (*masse spectrometry*) en tandem où ils sont isolés puis fragmentés par collision avec un gaz inerte, les masses résultantes des ions fragments peuvent être déterminées. La quantification des molécules dépend de nombreux paramètres, ce qui rend difficile l'utilisation de l'étalon interne. L'étalon interne idéal est de même structure que la molécule à analyser mais marqué par le carbone 13 pour le différencier. Il est ajouté à l'échantillon pour le test. Cependant, il peut ne pas toujours y avoir d'étalon interne spécifique à chaque molécule, ainsi l'étalon interne correspondra à une classe de lipides et non pas à un lipide spécifique (Jouhet *et al.*, 2017). Cette méthode nous permet de visualiser uniquement ce que nous recherchons dans notre échantillon. Le DAG et le MGDG sont dosés par rapport à un étalon interne de DAG. Le niveau de PG récupéré est quant à lui évalué par rapport à un étalon interne de SQDG.

RESULTATS

CHAPITRE I : Etude structurale et fonctionnelle de la monogalactosyldiacylglycérol synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana* : MGD1

La synthèse bibliographique a permis de mettre en évidence l'importance des galactolipides MGDG et DGDG dans le développement des plantes, la photosynthèse, et lors de situation de stress comme dans le cas de la carence en phosphate inorganique. MGD1 est l'enzyme primordiale chez *Arabidopsis thaliana* responsable de la synthèse de ces galactolipides essentiels, dont directement celle du MGDG, qui représente à lui seul 50 % des lipides présents dans les thylakoïdes et qui permet l'expansion rapide et massive des membranes des thylakoïdes en réponse à la lumière. Placée dans le contexte biologique de la photosynthèse, l'étude de la MGD1 est de première importance pour comprendre son fonctionnement et sa régulation *in planta*.

Des études antérieures ont permis d'établir un protocole d'expression et de purification de MGD1, amenant à l'obtention de la protéine sous forme monomérique, soluble et active, tout en gardant ses propriétés de liaisons à la membrane et en permettant ainsi des études fonctionnelles (Rocha *et al.*, 2013; Sarkis *et al.*, 2014).

La résolution de la structure 3D a permis de proposer un mécanisme réactionnel pour MGD1 mettant en exergue le rôle du résidu H155 comme la base catalytique supposée (Rocha *et al.*, 2016). La mutation de ce résidu en alanine abolit totalement l'activité de l'enzyme. Il a été montré que MGD1 avait besoin de lipides anioniques tels que le PG et l'AP pour être active mais le mécanisme d'activation reste à ce jour inconnu (Dubots *et al.* 2010). Dans cette étude, des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les résidus P189 et W287, localisés dans une boucle désordonnée du domaine N-terminal, comme jouant un rôle critique pour l'interaction de MGD1 avec le PG, favorisant ainsi l'ancrage de la protéine dans la membrane. Ces mutations entraînent une perte de l'activité de MGD1 en présence de PG tandis que l'activité de MGD1 est conservée en présence de PA.

Ces résultats acquis furent le point de départ de mon travail de thèse. Je me suis attachée à produire l'enzyme MGD1 native et mutée au niveau de ces trois résidus importants pour son activité (H155, P189 et W287) pour entreprendre de nouvelles études fonctionnelles

et comprendre le rôle du PG dans le mécanisme réactionnel. Les trois résidus ont été mutés en alanine, une mutation considérée neutre.

Ce premier chapitre se divise en cinq parties : dans la première et deuxième partie, je décrirai la production de MGD1 et des mutants, dans la troisième partie, nous nous concentrerons sur l'étude structurale de MGD1 et des mutants avec ses effecteurs ; puis dans la quatrième partie, nous nous intéresserons au côté fonctionnel de la protéine par mesure de son activité enzymatique, avec notamment, le développement d'un test d'activité par bioluminescence présenté dans la cinquième partie.

I. Expression de MGD1 et des mutants

L'expression sous forme recombinante de MGD1 et des mutants est réalisée selon les conditions décrites dans la partie I) du Matériels et Méthodes.

Pour rappel, la séquence primaire de MGD1 possède un peptide transit du résidu 1 au résidu 106 en position N-terminale, suivi d'une courte séquence du résidu 107 au résidu 136, prédite comme étant désordonnée et non nécessaire à l'activité de l'enzyme (Dubots *et al.* 2010). Les résidus 137 à 533 correspondent au domaine catalytique de l'enzyme. C'est cette partie de la protéine, fusionnée à une étiquette 6-Histidine en position C-terminale, qui a été exprimée sous forme recombinante dans *E. coli*.

L'analyse en gel SDS-PAGE montre bien une bande aux alentours de 44 kDa, correspondant au poids moléculaire de notre protéine, bien plus marquée après induction à l'IPTG (T₄), confirmant la surexpression de MGD1 (Figure 39-A). Les résultats obtenus en gel SDS-PAGE montre également que la protéine produite est en grande quantité sous forme soluble (Figure 39-A).

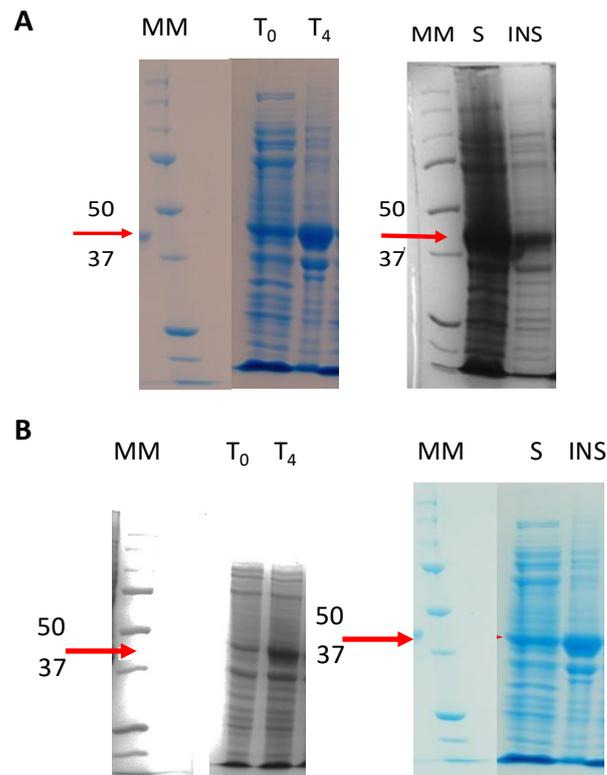


Figure 39 : (A) Analyse par SDS-PAGE de la production de MGD1 native avant (T_0) et après induction pendant 4 heures (T_4) à l'IPTG (0,25 mM) à 30°C. MM : marqueurs moléculaires en kDa, S : fraction soluble déposée, INS : fraction insoluble. Révélation au bleu de Coomassie. La flèche rouge indique le poids moléculaire correspondant à notre protéine, soit 44 kDa. (B) Analyse par SDS-PAGE de la production du mutant W287A avant (T_0) et après induction pendant 4 heures (T_4) à l'IPTG (0,25 mM) à 30°C. MM : marqueurs moléculaires en kDa, S : fraction soluble déposée, INS : fraction insoluble. Révélation au bleu de Coomassie. La flèche rouge indique le poids moléculaire correspondant à notre protéine, soit 44 kDa.

Nous avons appliqué le même protocole d'expression pour produire les trois mutants de MGD1 : H155A, P189A et W287A. Les mêmes résultats que la protéine native ont été obtenus pour la production des mutants H155A et P189A (résultats non montrés). Les résultats de la production du mutant W287A sont, quant à eux, différents. En effet, l'analyse par SDS-PAGE de la production de ce mutant montre que l'expression est bien induite par ajout d'IPTG (0,25 mM) (Figure 39-B) mais que la plus grande majorité de la quantité du mutant se retrouve dans la fraction insoluble de l'extrait bactérien, contrairement aux autres mutants (Figure 39-B). Ayant suffisamment de protéine dans la partie soluble, nous avons pu poursuivre avec l'étape de purification.

II. Purification de MGD1 et des mutants

La protéine ainsi exprimée dans *E. coli* peut ensuite être purifiée selon le protocole établi précédemment (Rocha *et al.*, 2013) et décrit dans la partie II) du Matériels et Méthodes.

Le protocole implique deux étapes de purification :

- (1) Chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap
- (2) Gel filtration (ou chromatographie d'exclusion stérique)

La Figure 40 montre les résultats typiquement obtenus lors de la purification de la protéine MGD1 native, à partir de 3 litres de culture. La Figure 40-A correspond au chromatogramme de la chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap. Le cadre rouge correspond aux fractions contenant la protéine d'intérêt, comme le montre l'analyse par SDS-PAGE (Figure 40-B). Les fractions correspondantes à MGD1 sont rassemblées et concentrées à l'aide d'un concentrateur possédant un seuil de coupure de 30 kDa jusqu'à obtenir une concentration entre 15-20 mg/mL. L'échantillon concentré est injecté sur une colonne Superdex S200 pour la deuxième étape de purification (Figure 40-C, 41-D). Les fractions correspondant à la protéine sont collectées et concentrées à environ 10 mg/mL. Cette purification en 2 étapes permet d'obtenir environ 5 mg de protéine pure par litre de culture.

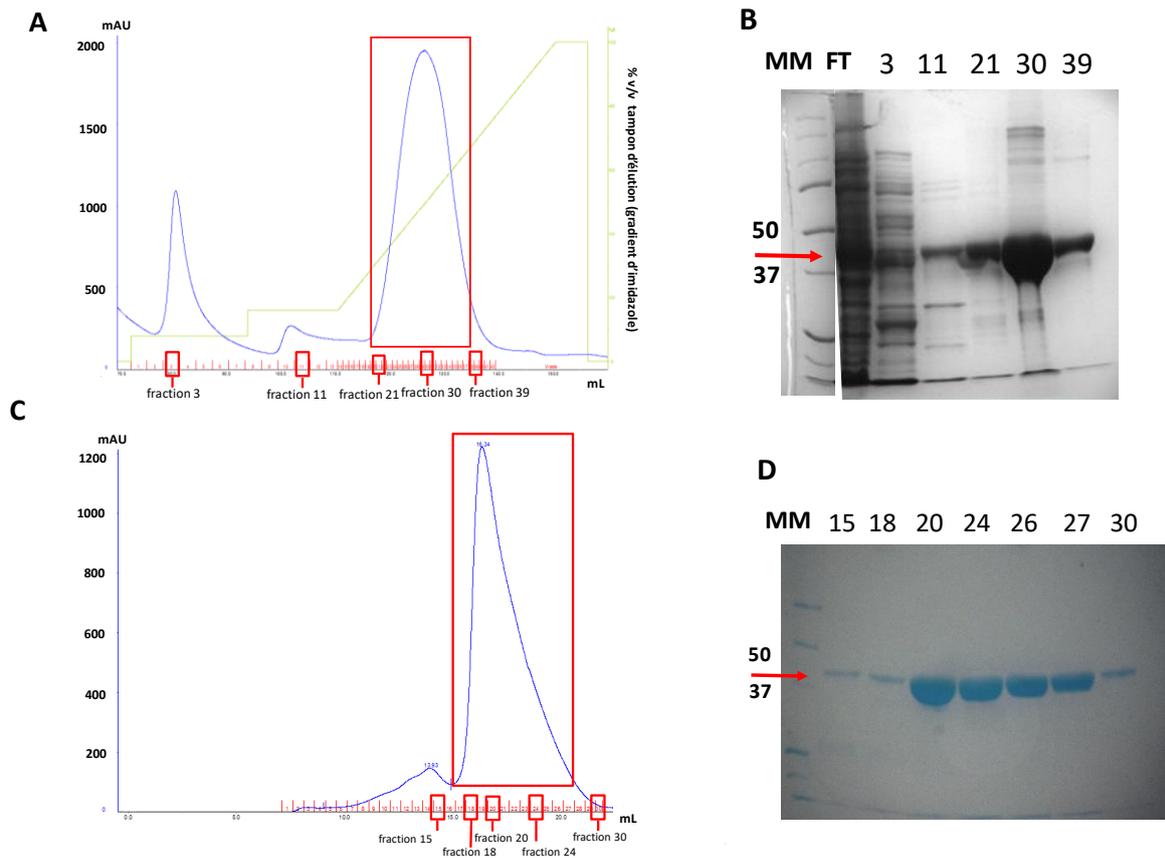


Figure 40 : Purification de la protéine MGD1 native. (A) Purification par chromatographie d'affinité sur une colonne HisTrap de 5 mL suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm. La ligne verte représente le gradient d'imidazole appliqué afin de décrocher les protéines fixées à la colonne. Le cadre rouge correspond aux fractions contenant la protéine d'intérêt. (B) Analyse par SDS-PAGE de la première étape de purification. MM : marqueur en kDa ; FT : fraction non retenue (flow through), 3, 11, 21, 30, 39 : fractions d'élution. Révélation au bleu de Coomassie. La flèche rouge indique le poids moléculaire correspondant à notre protéine. (C) Purification par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de 24 mL Superdex 200. Le cadre rouge correspond aux fractions contenant la protéine d'intérêt. (D) analyse par SDS-PAGE de la deuxième étape de purification.

La qualité de la préparation protéique est évaluée par la technique de Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) qui permet d'évaluer la polydispersité d'un échantillon. Pour une protéine monodisperse de 44 kDa, un seul pic fin est attendu aux alentours de 10 nm (Figure 41).

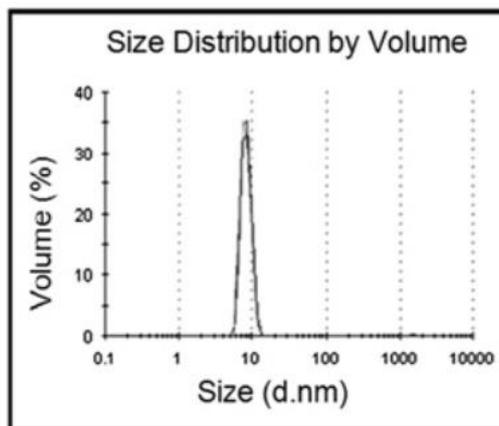


Figure 41 : Analyse par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) de la protéine MGD1 purifiée.

Les purifications des mutants ont été réalisées avec le même protocole que MGD1 native. Nous avons obtenu des rendements et une qualité d'échantillon identique pour les mutants H155A et P189A.

Cependant, des problèmes pour la purification du mutant W287A ont été rencontrés. Nous avons vu dans le paragraphe précédent que ce mutant était moins bien produit et qu'il formait davantage de corps d'inclusion. Cette mutation d'un Trp en Ala semble rendre plus instable la protéine, ce qui expliquerait les difficultés rencontrées. La Figure 42 montre les résultats de la purification du mutant W287A. Outre les rendements beaucoup plus faibles (valeur d'absorbance de 40 milli-unités d'absorbance (mAU) contre plus de 1000 mAU pour MGD1) observés après la première étape de chromatographie d'affinité (Figure 42-A et 43-B, cadre rouge), c'est une fraction protéique hétérogène ayant tendance à s'agréger qui est obtenue. En effet, comme le montre l'analyse sur colonne Superdex 200 (Figure 42-C et 43-D), le comportement du mutant W287A est anormal et donne un profil d'élution très différent de la protéine native. Ce profil d'élution laisse supposer que ce mutant interagit avec la colonne S200, colonne composée d'agarose réticulé et de dextran.

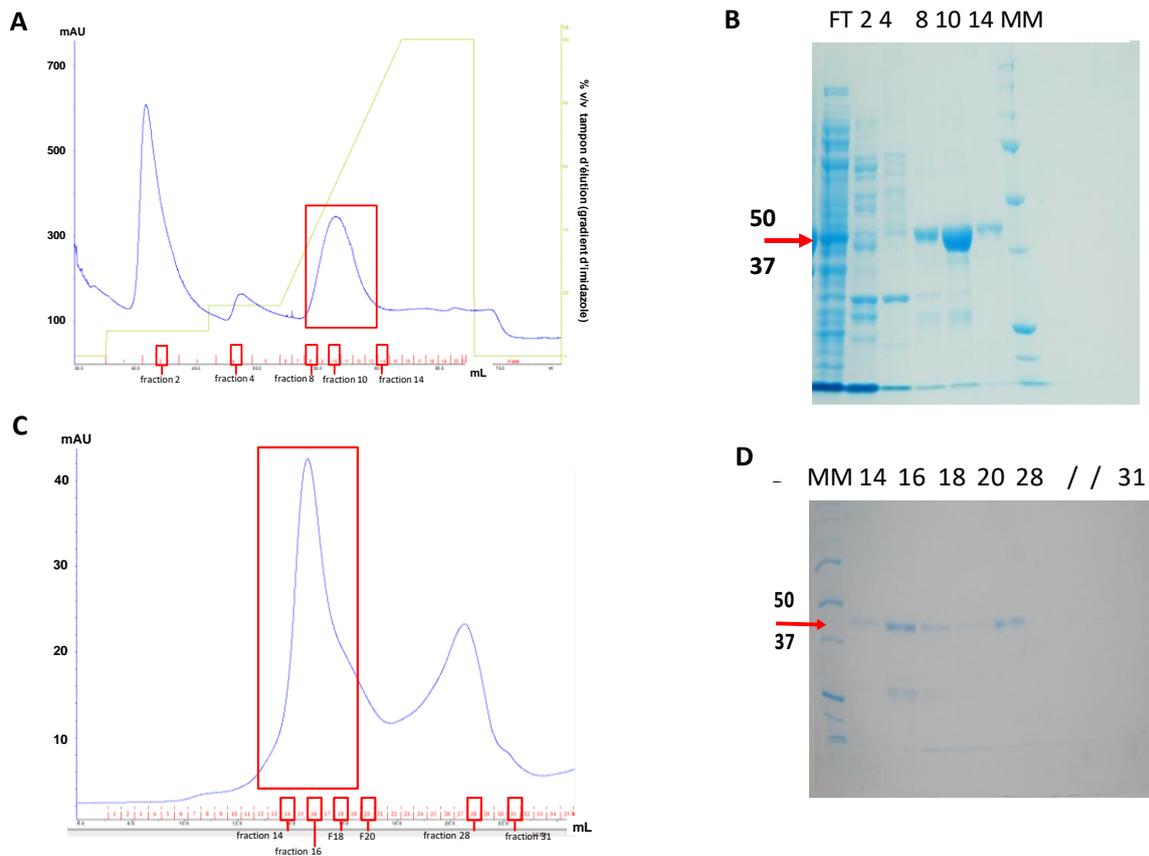


Figure 42 : Purification du mutant W287A (A) Purification par chromatographie d'affinité sur une colonne HisTrap de 1 mL. La ligne verte représente le gradient d'imidazole appliqué. Le cadre rouge correspond aux fractions contenant la protéine d'intérêt. (B) Analyse par SDS-PAGE de la première étape de purification. MM : marqueur en kDa ; FT : flow through, 2, 4, 8, 10, 14 : fractions d'élution. Révélation au bleu de Coomassie. La flèche rouge indique le poids moléculaire correspondant à notre protéine. (C) Purification par chromatographie d'exclusion stérique par une colonne de 24 mL Superdex 200. Le cadre rouge correspond aux fractions contenant la protéine d'intérêt. (D) SDS-PAGE des fractions éluées.

Nous avons cherché à optimiser la production de ce mutant W287A en jouant notamment sur les conditions d'expression (température d'induction, durée, concentration en IPTG). L'objectif était de produire une protéine plus soluble qui se comporterait mieux lors des étapes de purification. Malheureusement aucune amélioration n'a été observée. L'optimisation de la purification de ce mutant W287A nécessiterait trop de temps, c'est pourquoi nous avons décidé de focaliser notre attention uniquement sur le mutant P189A.

III. Etude cristallographique de MGD1

1) Essais précédents

La cristallographie est la méthode expérimentale la plus utilisée pour déterminer la structure 3D des macromolécules biologiques à l'échelle atomique.

De nombreuses expériences antérieures de cristallographie ont été réalisées au laboratoire avec la protéine MGD1 native ou mutée dans différentes conditions, afin d'obtenir des cristaux de MGD1 en complexe avec l'UDP-Gal, et/ou ses ligands lipidiques (DAG, PG, AP). Ces expériences ont été réalisées soit avec la technique du « *soaking* » (trempage des cristaux avec le ligand), soit par co-cristallisation. Les premiers cristaux de l'apoenzyme et de MGD1 complexée avec l'UDP-Gal ont été obtenus dans les conditions du Tableau 4 (Rocha *et al.*, 2016).

	ApoMGD1	Complexe MGD1/UDP-Gal
Concentration de la protéine (mg/mL)	6	6
Ratio protéine/précipitant	1:2	1:1
Solution précipitante	200 mM MgCl ₂ 22% (W/v) PEG 3350	18-25 % (v/v) Ethylene glycol
Additif	30 mM glycyl-glycyl-glycine	
Concentration UDP-Gal (mM)		20
Concentration PG (mM)		1
Cristaux obtenus		

Tableau 4 : Conditions de cristallographie pour l'apoenzyme MGD1 et le complexe MGD1/UDP-Gal (Rocha *et al.*, 2016).

La résolution de la structure a mis en évidence que l'agencement des molécules au sein du cristal conduisait à la présence d'une boucle d'une molécule bloquant l'entrée du site actif d'une autre molécule. Cet agencement empêche la fixation des ligands dans le site actif, expliquant tous les échecs des essais de « *soaking* ».

Dans les cristaux obtenus par co-cristallisation avec le complexe MGD1 : UDP-Gal, seul l'UDP a été mis en évidence dans la carte de densité électronique. Différentes explications sont possibles :

- l'UDP-Gal est présent mais le galactose n'est pas visible dans la structure ;
- l'hydrolyse de l'UDP-Gal par l'enzyme ;
- les conditions de cristallographie provoquent elle-même l'auto-hydrolyse du substrat par changement des conditions.

2) Mes résultats

L'un des objectifs de ma thèse a consisté à rechercher des conditions de cristallisation permettant d'obtenir des complexes de MGD1 avec l'UDP-Gal intact d'une part et des complexes contenant l'accepteur DAG et/ou l'activateur PG.

Différentes expériences ont ainsi été réalisées avec MGD1 native, en complexe avec l'accepteur DAG et l'activateur PG ou en complexe avec le CN442, un analogue du MGDG fourni par Joanne Xie (ENS Cachan) (Figure 43), et de l'UDP (Tableau 5).

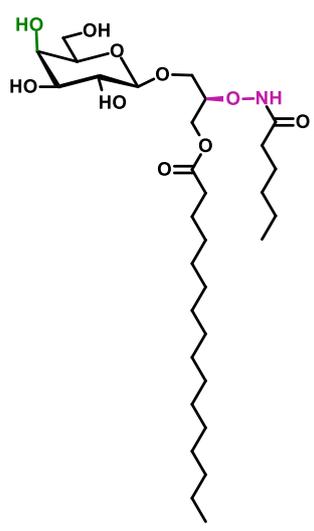


Figure 43 : Structure du CN442, analogue du MGDG.

Certaines conditions ont permis d'obtenir des cristaux mais ils n'ont malheureusement pas donné de clichés de diffractions avec une résolution suffisante pour pouvoir être exploités.

D'autres expériences ont été réalisées avec le mutant inactif H155A. L'intérêt de ce mutant était d'obtenir un complexe avec l'UDP-gal intact et si possible en complexe avec des lipides grâce à son inactivité et donc minimisant le risque que le sucre donneur soit hydrolysé.

J'ai d'abord réalisé des expériences de cristallisation avec le mutant H155A seul qui m'ont permis d'obtenir sa structure, selon les conditions indiquées dans la première ligne du Tableau 5. J'ai ensuite testé différentes conditions, afin d'obtenir le mutant H155A en complexe avec le sucre donneur, l'accepteur ou/et l'activateur, décrite dans le Tableau 5. Certaines de ses conditions ont permis d'obtenir des cristaux, mais de taille trop petite pour obtenir un cliché de diffraction exploitable.

Nom de la protéine	Concentration de la protéine (mg/mL)	Ligand	Solution précipitante	Ratio Protéine / précipitant	résultats
H155A	6	-	0,15 M [MgCl ₂], 22% PEG 3350	Ratio 1 : 2	Structure obtenue
H155A	6	5 mM UDP-Gal (proméga)	0,2 M NaBr, 20% PEG 3350	Ratio 1 : 1	Pas de diffraction : cristaux trop petits
H155A	6	1 mM PG	MgCl ₂ , PEG 3350	Ratio 1 : 1 ou 1 : 2	cristal cubique
H155A	4 ou 6	20 mM UDP-Gal 1 mM PG	Ethylène glycol	Ration 1 : 2 ou 1 : 1	Rien
H155A	6	20 mM UDP-Gal (proméga)	NaBr, PEG 3350	Ratio 1 : 1	rien
H155A	6	1 mM DAG 1 mM PG	NaK, PEG 3350	Ratio 1 : 1 et 1 : 2	Cristaux pour différentes conditions
H155A	6	20 mM UDP-Gal 1 mM PG 1 mM DAG	NaK, PEG 3350	Ratio 1 : 1 et 1 : 2	rien
MGD1	4	2 mM CN442	NaK, PEG 3350	Ratio 1 : 2	Cristaux (oursins) ⇒ Seeding : étoiles
MGD1	4 ou 6	1 mM DAG 1 mM PG	NaK, PEG 3350	Ratio 1 : 1 ou 1 : 2	grandes aiguilles et petites aiguilles
MGD1	6	CN442 UDP	NaK, PEG 3350		rien
MGD1	6	1 mM DAG 1 mM PG	NaK, PEG 3350	Ratio 1 : 1 et tester à 16% ratio 1 : 2	petites aiguilles

Tableau 5 : Récapitulatif des différentes conditions testées lors de ma thèse pour obtenir des cristaux de la MGD1 native et du mutant H155A en complexe avec des lipides et/ou des nucléotides-(sucre).

IV. Tests d'activité de MGD1 et des mutants avec effecteurs

Le niveau d'activité de la protéine (exprimé en nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine) était quantifié jusque-là par un test radioactif permettant le suivi du transfert du galactose radioactif à partir de l'UDP-¹⁴C-gal sur le DAG, en présence d'AP ou de PG. Ces tests d'activité avaient été réalisés initialement dans le tampon 50 mM MOPS-NaOH pH 7,8, 6 mM CHAPS, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 2% glycérol avec ajout des substrats donneurs (700 μM UDP-¹⁴C-gal) et accepteurs (6,3 mol% DAG) de la MGD1 (11 ng/μL) ainsi qu'avec les lipides anioniques, AP (1,5 mol%) ou PG

(1,5 mol%), nécessaires pour son activité. Suite à l'optimisation récente du protocole de purification, les tests d'activité sont désormais réalisés dans les mêmes conditions mais avec le tampon composé de 25 mM Bis-Tris, pH 6,5, 150 mM NaCl, 5% glycérol, 1 mM TCEP, 6 mM CHAPS (Rocha *et al.*, 2013). Ce choix a été dicté par la meilleure stabilité de MGD1 dans ce tampon. Ces dernières conditions ont donc été utilisées pour comparer l'activité de la protéine MGD1 recombinante native et des mutants (Figure 44).

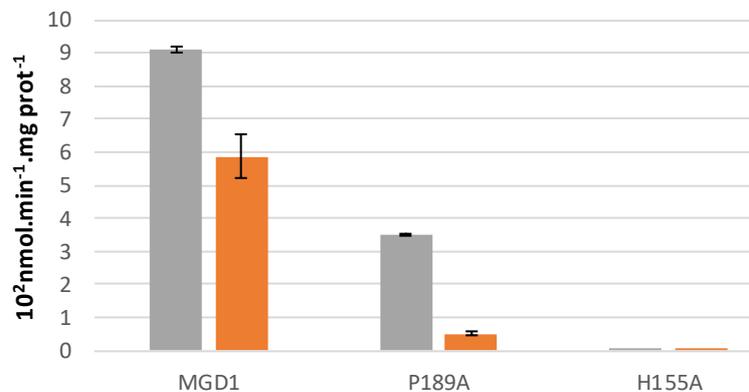


Figure 44 : Influence de l'acide phosphatidique (AP en gris) ou du phosphatidylglycérol (PG en orange) sur l'activité de la MGD1 native et sur les mutants P189A, H155A.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment (Dubots *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2013). En effet, on remarque une activité spécifique plus importante avec l'AP que le PG pour MGD1 native. Par ailleurs, pour le mutant P189A, on observe une perte importante de l'activité de l'enzyme en présence d'AP (environ 60 %), par rapport à la protéine native et une baisse de plus de 90 % en présence de PG. Ces résultats mettent en évidence que le résidu P189 entraîne une réduction très importante de l'activité de la protéine en présence de PG, ce qui suggère que ce résidu pourrait jouer un rôle dans l'interaction de la protéine avec le PG. Le mutant H155A présente une abolition complète de son activité en présence d'AP ou de PG, comme attendu puisque le résidu H155 est proposé comme base catalytique.

Dans ces conditions, le mutant W287A s'est révélé le plus souvent inactif, tant en présence du PG que du PA. Cependant les problèmes rencontrés lors de sa purification, notamment une grande instabilité, ne permettent pas de conclure de façon claire sur son activité et donc de conforter les résultats obtenus précédemment par (Dubots *et al.* 2010), à savoir un comportement similaire au mutant P189A (activité en présence de AP uniquement).

V. Développement d'un test d'activité de MGD1 par bioluminescence

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai eu l'occasion de mettre au point une nouvelle méthode de dosage de l'activité de MGD1 permettant de s'affranchir de l'utilisation de substrats radioactifs. En effet, la technique de l'UDP-Glo, kit commercial vendu par Promega, utilisant la bioluminescence semblait être une méthode alternative intéressante. La réaction catalysée par la glycosyltransférase va libérer de l'UDP, qui va être converti simultanément en ATP, grâce à l'ajout d'un réactif spécifique. La luciférase va ensuite catalyser sa réaction et générer de la lumière. Le signal est proportionnel à la concentration en UDP libéré ce qui permet de déterminer l'activité de l'enzyme (Figure 30).

Pour mettre au point ce dosage par l'UDP-Glo, nous nous sommes basés sur le protocole des tests d'activité par mesure de la radioactivité, nous permettant d'avoir des conditions similaires d'expériences et ainsi de pouvoir comparer les résultats obtenus avec ces deux techniques. Le milieu réactionnel est identique (volume final 36,5 μ L) et la réaction est initiée par addition du substrat UDP-Gal. Pour la mise au point de la méthode, différentes concentrations d'enzymes et différents temps d'incubation ont été utilisés. La réaction est arrêtée en prélevant 25 μ L du milieu réactionnel ajoutés à 25 μ L de réactif UDP-Glo préalablement répartis dans les puits d'une microplaque. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, la mesure de bioluminescence peut être effectuée.

Pour ces expériences de bioluminescence, la quantité d'enzyme recommandée par le fournisseur varie de 1 à 100 ng (pour rappel, on utilise 400 ng par essai dans le test radioactif). La gamme étalon d'UDP donne une réponse en luminescence linéaire sur une gamme de concentration allant de 0,02 à 0,8 μ M (Figure 45-A, 45-B). De nos premiers tests, nous avons décidé de nous placer dans une gamme de valeurs de luminescence inférieure à 500 000 unités arbitraires (50×10^4 UA). Nous avons donc testé dans un premier temps trois concentrations différentes d'enzyme, en présence d'AP, au temps fixe de 10 minutes : 10, 50 et 100 ng (Figure 45-C). Les résultats montrent qu'avec 10 ng de MGD1, nous sommes déjà hors de la limite de signal fixée.

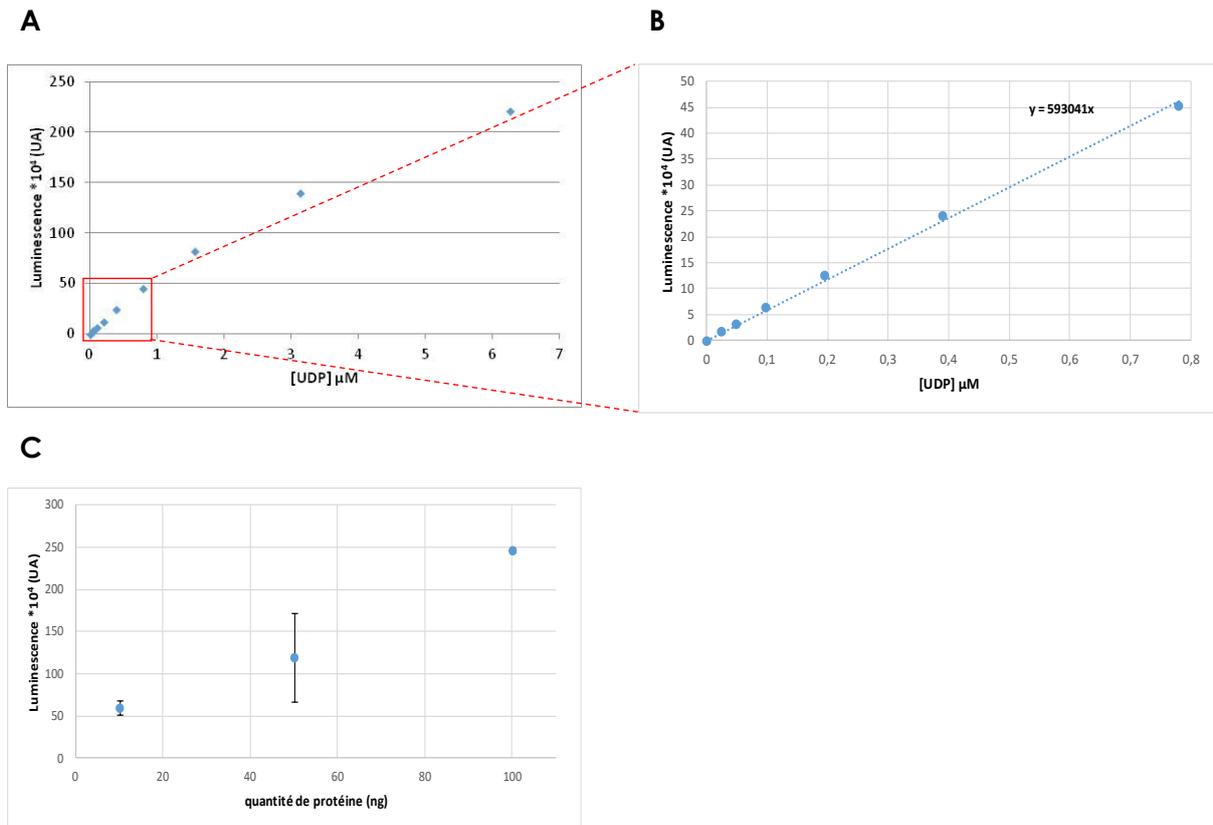


Figure 45: (A) Gamme étalon d'UDP, (B) zoom de la gamme étalon sur les valeurs de concentrations en UDP allant de 0 à 0,8 μM , (C) Valeurs de luminescence en fonction de la quantité de protéine MGD1 : 10, 50 ou 100 ng en présence d'AP sur un temps de réaction de 10 minutes.

Les résultats des tests d'activité de MGD1 (10 ng) en présence d'AP (Figure 46) montrent une réponse non linéaire au cours du temps. Après plusieurs essais d'optimisation, nous avons opté pour les conditions suivantes : les tests d'activité en présence d'AP seront menés avec 1 ng de MGD1 par essai sur un temps compris entre 1 et 10 min. Pour les essais d'activité avec PG, la quantité de MGD1 sera de 5 ng de MGD1 par essai (l'activité de MGD1 en présence de PG étant moins importante que celle en présence d'AP).

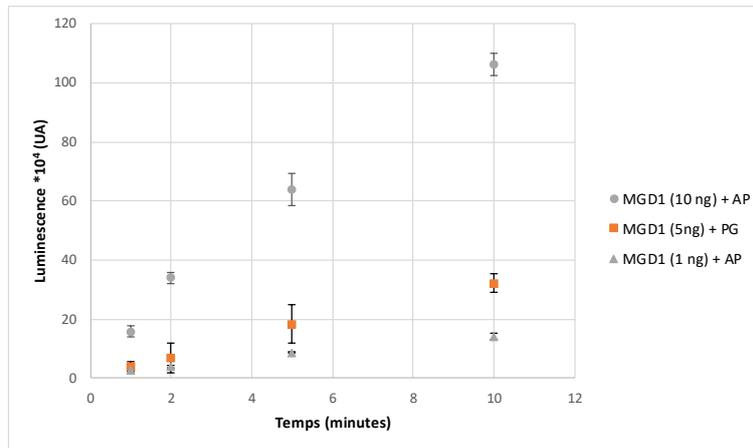


Figure 46 : Cinétique de MGD1 par le test en luminescence en présence de l'accepteur DAG et de l'AP ou de MGD1 en présence de l'accepteur DAG et du PG.

La Figure 47 montre les résultats d'activité spécifique obtenus pour MGD1 en présence d'AP ou de PG. Comme le test de radioactivité, MGD1 perd 60 % de son activité en présence de PG par rapport à l'AP et elle perd 97 % de son activité en absence de lipides anioniques.

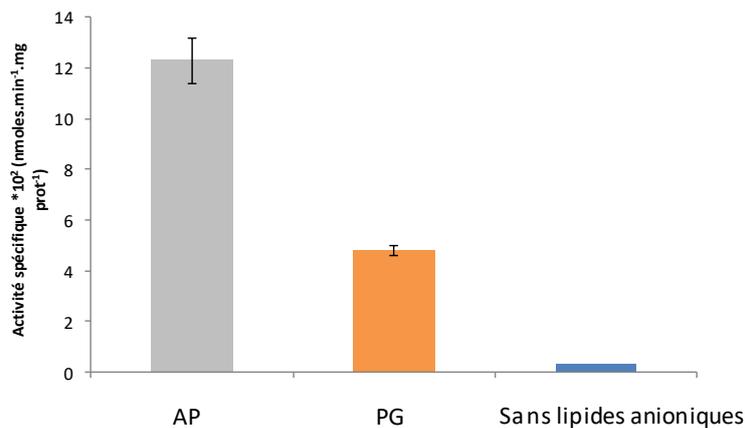


Figure 47 : Influence de l'acide phosphatidique (AP) ou du phosphatidylglycérol (PG) sur l'activité de MGD1 avec les tests UDP-Glo.

Nous avons ensuite appliqué ce test de mesure d'activité par bioluminescence aux mutants de MGD1. Les résultats obtenus pour le mutant H155A confirment que ce mutant est inactif en présence d'AP ou de PG et en absence de lipides anioniques (Figure 48 et Tableau 6).

RESULTATS

Concernant le mutant P189A, les résultats obtenus en radioactivité ont également été confirmés : ce mutant perd quasiment la moitié de son activité en présence d'AP et il est inactif en présence de PG (Figure 48 et Tableau 6).

Si l'on compare les résultats obtenus avec cette technique à ceux obtenus par mesure de la radioactivité (Figure 44 et Tableau 6), on observe que nous sommes dans le même ordre de grandeur.

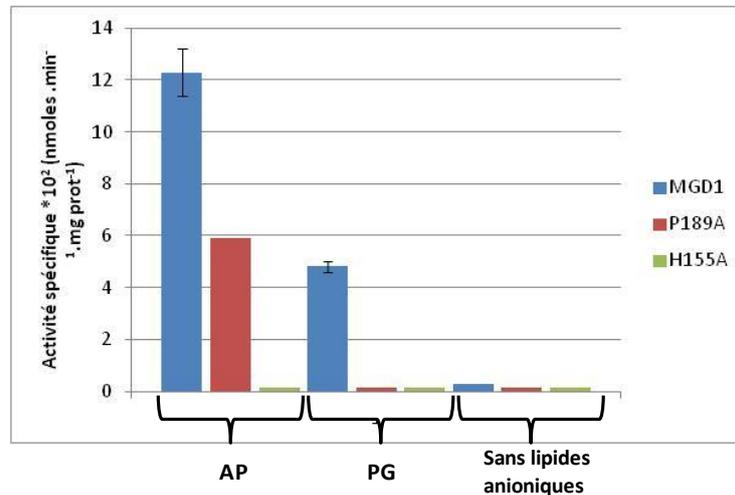


Figure 48 : (A) Comparaison des résultats d'activité spécifique de MGD1, du mutant P189A, du mutant H155A en présence d'AP ou de PG, ou en absence de lipides anioniques obtenus en bioluminescence.

	UDP-Glo (activité spécifique *10 ² nmoles.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)		Radioactivité (activité spécifique *10 ² nmoles.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	
	AP	PG	AP	PG
MGD1	12	4,7	9	5,9
P189A	5,9	0	3,5	0,5
H155A	0	0	0	0

Tableau 6 : Comparaison des valeurs obtenues pour la MGD1 native et les mutants H155A et P189A avec la technique de l'UDP-Glo ou les tests de radioactivité.

En conclusion, la technique de bioluminescence est adaptable aux tests d'activité de nos protéines. Cette technique est très sensible (1 à 5 ng d'enzyme) et présente un gain de temps au niveau de la mesure du produit UDP formé, comparée au test par radioactivité qui

RESULTATS

utilise 400 ng d'enzyme et qui nécessite d'extraire le MGDG formé. Cette technique a également pour avantage d'éviter l'utilisation d'éléments radioactifs.

CHAPITRE II : Etudes des propriétés d'association membranaire de MGD1 et de ses mutants par la technique des monocouches de Langmuir

Le chapitre I a permis la production des protéines recombinantes pures et fonctionnelles, à l'exception du mutant W287A. Le chapitre II vise, à présent, à étudier les propriétés de liaison de MGD1 et de ses mutants (H155A et P189A) à une membrane. En effet, ces propriétés sont cruciales pour la fonction de l'enzyme puisqu'elle doit se lier à la fois au substrat soluble dans l'eau (UDP-Gal) et au substrat accepteur hydrophobe (DAG) mais aussi à son activateur lipidique, en l'occurrence le PG dans le cas de cette étude.

La technique des monocouches de Langmuir a été utilisée pour comprendre le comportement de l'enzyme native et mutée vis-à-vis de systèmes membranaires modèles composés de DAG et/ou de PG. La microscopie à force atomique (AFM pour *atomic force microscopy*) a été utilisée pour observer la topographie de la surface de la monocouche après interaction avec les protéines.

Cette étude nous a permis de mieux comprendre le rôle du PG et de proposer un nouveau modèle de mécanisme réactionnel pour MGD1. Ces résultats ont fait l'objet d'un article rédigé pendant ma thèse et actuellement soumis à publication. Dans un premier temps, les mises au point expérimentales requises pour les études en monocouches seront décrites puis dans un deuxième temps, un résumé de l'article suivi de la publication seront présentés. Dans un troisième temps, les résultats complémentaires non publiés seront décrits.

I. Mise au point du protocole expérimental

1) Conditions d'expériences en monocouches

Les études antérieures ont mis en évidence que la composition lipidique du mélange avait une influence sur les capacités de liaison de MGD1 à la membrane. Cependant, les conditions expérimentales étaient différentes des miennes, sur certains aspects. En effet, le tampon utilisé était composé de 50 mM MOPS, 23 mM K_2HPO_4 , 23 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 2% glycérol pH 7,8, et les expériences étaient réalisées à des températures comprises entre 19 et 22°C (Sarkis *et al.*, 2014). Entre temps, le tampon utilisé pour la

purification de MGD1 a été modifié (Rocha *et al.*, 2013). Il est actuellement composé de 25 mM Bis-tris pH 6,5, 150 mM NaCl, 5% glycérol, 1mM TCEP. En tout premier lieu, nous avons vérifié que ces changements de conditions expérimentales n’avaient pas d’influence sur les capacités de liaison de la protéine native MGD1.

A partir des conditions expérimentales pré-établies (Sarkis *et al.*, 2014), les résultats obtenus par le Dr Sarkis ont été comparés à ceux enregistrés dans les nouvelles conditions. Le but étant de voir si ces modifications (pH, température) entraînaient des changements concernant le comportement de MGD1 avec les monocouches lipidiques. Mes conditions expérimentales sont les suivantes : tampon composé de 25 mM Bis-tris pH 6,5, 150 mM NaCl, 5% glycérol, 1mM TCEP et température thermostatée à 25°C.

Les tests comparatifs ont été réalisés sur une monocouche de PG. Les résultats obtenus ont montré une similarité au niveau de la cinétique d’adsorption de MGD1 (variation de pression de surface π (mN/m) en fonction du temps - Figure 49), avec une valeur de $\Delta\pi$ de 11,9 mN/m avec le tampon utilisé par le Dr Sarkis et une valeur de $\Delta\pi$ de 12 mN/m avec le tampon de la protéine utilisé dans le cadre de cette thèse. Les expériences ont ainsi pu être poursuivies avec le nouveau tampon (Rocha *et al.*, 2013).

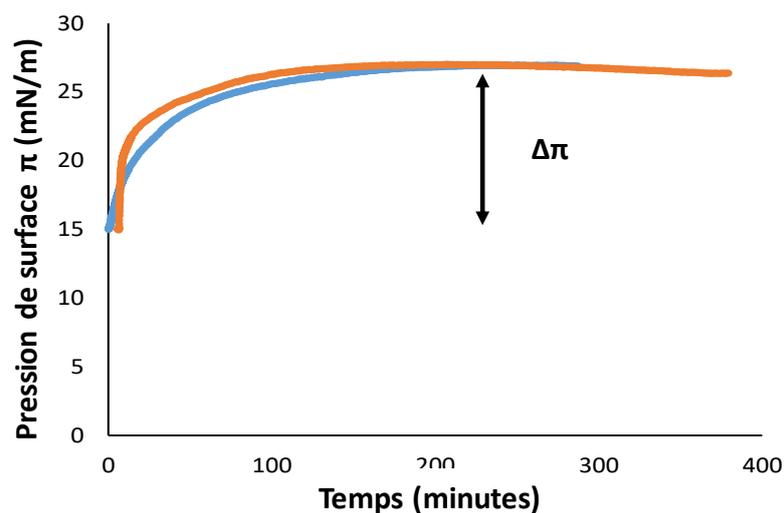


Figure 49 : Comparaison des courbes de la pression de surface (π) en fonction du temps de MGD1 lors de l’adsorption sur une monocouche de PG dans le tampon pH 7,8 (bleu) ou le tampon pH 6,5 (orange).

2) Isothermes du PG, du DAG ou du mélange DAG-PG (1 :3 mol/mol)

La compression du film lipidique est suivie par mesure de la pression de surface (π), ce qui va permettre de tracer une isotherme caractéristique du mélange utilisé. Cette pression exercée par les molécules est reliée à l'aire moléculaire moyenne (\AA^2) occupée à chaque instant par une molécule à la surface du tampon. Nous pouvons obtenir une isotherme qui reflète l'état d'organisation des molécules pendant leur compression. Nous avons ainsi, pour chaque composition de monocouche, une isotherme réalisée à 25°C, température correspondante à nos conditions expérimentales.

L'étude des isothermes π -A (pression de surface (π) en fonction de l'aire moléculaire moyenne occupée par une molécule à la surface du tampon (\AA^2)) des monocouches formées de mélanges de lipides renseigne sur leur état d'organisation (Liquide Expansé (LE), Liquide Condensé (LC), phase de transition).

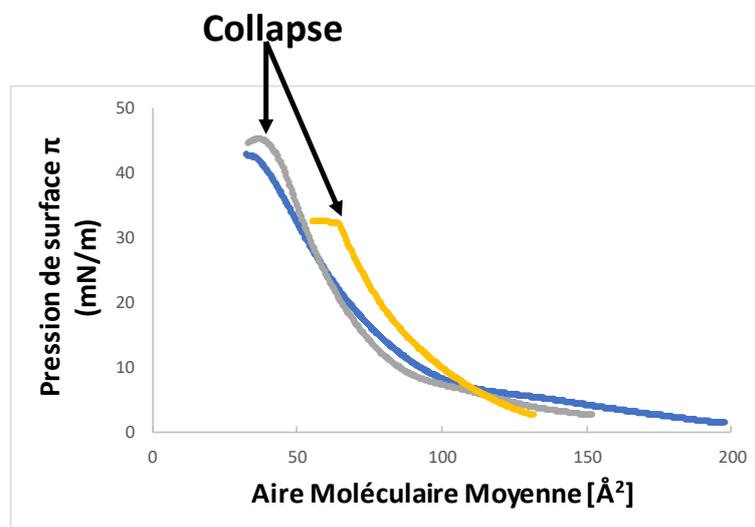


Figure 50 : Isothermes π -A du PG à 25°C (bleu), du DAG à 25°C (jaune) et du mélange DAG-PG (1 :3 mol/mol) (gris).

L'isotherme de PG (Figure 50, courbe bleue) révèle que la monocouche présente une transition de phase liquide expansé – liquide condensé (LE-LC) au début de sa compression à 25°C. Le collapse est atteint à 42 mN/m pour une aire moléculaire moyenne de 37 \AA^2 indiquant que l'on est bien en phase LC en fin de compression.

L'isotherme de DAG (Figure 50, courbe jaune) révèle que la monocouche ne présente qu'une seule phase au cours de sa compression à 25°C. Le collapse est atteint à 32 mN/m pour une aire moléculaire moyenne de 66 Å² indiquant que l'on est en phase fluide (LE).

L'isotherme du mélange DAG-PG (1 :3 mol/mol) (Figure 50, courbe grise) présente une transition de phase au début de sa compression à 25°C. Le collapse est atteint à 44 mN/m pour une aire moléculaire moyenne de 41 Å² indiquant que l'on est en phase LC au-delà de la transition de phase.

L'analyse de ces isothermes montre l'effet du PG sur une monocouche de DAG : la présence de PG rigidifie la monocouche de DAG.

3) Etude de la stabilité des monocouches

Avant d'étudier l'effet de MGD1 et de ses mutants sur le mélange DAG-PG (1 :3 mol/mol), il était important d'en connaître sa stabilité. Pour cela, nous avons déposé le mélange lipidique et compressé jusqu'à atteindre une pression de 15 mN/m, pression ayant été admise comme celle permettant la meilleure insertion de notre protéine dans la monocouche (Sarkis *et al.*, 2014). Les faibles variations de pression (variations comprises entre 14 et 15,7 mN/m) enregistrées pendant l'expérience révèle la stabilité de la monocouche composée de DAG-PG (1:3) mol/mol à 25°C sur le tampon utilisé.

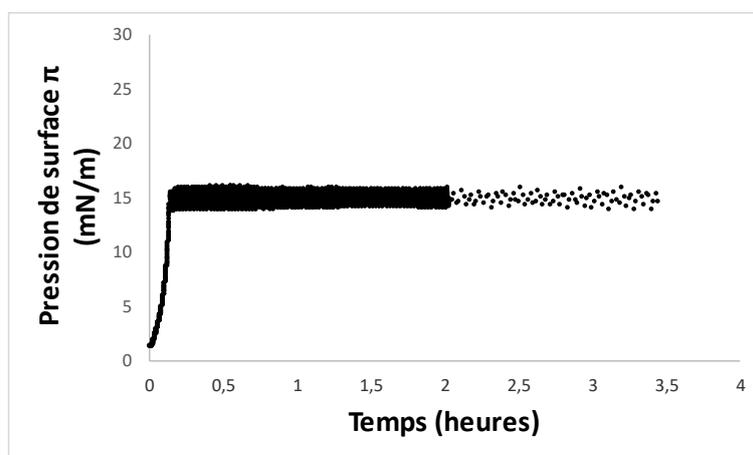


Figure 51 : Evolution de la pression de surface (π) en fonction du temps du mélange DAG-PG (1 :3 mol/mol) initialement comprimé à 15 mN/m à 25°C.

II. Résumé de l'article

Afin de mieux comprendre le rôle du PG dans la liaison membranaire de MGD1 et en tant qu'activateur de cette dernière, nous avons exploré les propriétés de liaison de MGD1 native et des deux mutants, P189A et H155A. Ces deux mutants ont été ciblés car la résolution de la structure cristallographique de MGD1 a mis en évidence, d'une part, que le résidu proline 189 serait un résidu potentiel impliqué dans la liaison au PG et, d'autre part, que le résidu histidine 155 serait le résidu catalytique supposé. MGD1 étant une protéine membranaire monotopique ancrée dans l'IEM des chloroplastes, nous avons utilisé les monocouches de Langmuir comme modèles membranaire biomimétiques, afin de mieux comprendre les effets de ces mutations sur le processus d'ancrage membranaire et ainsi, apporter de nouvelles informations sur l'activation de MGD1 par les lipides anioniques. Pour cela, différentes monocouches composées de PG et/ou de DAG, purs, ou en mélange dans différents rapports molaires ont été étudiées.

Brièvement, les résultats des paramètres de liaison (MIP, synergie d'interaction (α) et différentiel $d\pi_0$) obtenus avec différentes compositions de monocouches pour chaque protéine recombinante, ont d'une part, confirmé l'implication du résidu P189 dans l'interaction de MGD1 avec le PG, et d'autre part, mis en évidence que le résidu H155, en plus de son rôle supposé comme base catalytique, interagit également avec le PG. Cette interaction serait responsable du rôle activateur du PG par augmentation de la nucléophilie de H155 lors du processus catalytique.

En complément de ces études d'interaction, des études AFM ont été réalisées pour observer la topographie de la surface de la monocouche après interaction avec la protéine. Elles ont permis de montrer que la protéine native génère une organisation au sein de la monocouche qui change selon la nature des lipides. A titre d'exemple, la présence du DAG, substrat de la protéine, favorise la formation des interactions protéines-protéines visibles par la présence de larges complexes. L'étude des images obtenues avec le mutant P189A montre qu'il perd ses capacités à former ses complexes. Quant au mutant H155A, il a également perdu sa capacité à former de grands agrégats, ce qui a été attribué à sa plus faible affinité pour son substrat accepteur. Cependant, les images AFM ont montré que ce mutant induit une

réorganisation des monocouches en présence de PG, suggérant ainsi un phénomène de ségrégation lipidique dû à une exclusion probable des molécules de PG.

En prenant en compte tous ces résultats, notre étude a permis de proposer un mécanisme réactionnel pour l'activation de MGD1 par le PG, suggérant ainsi l'existence d'une dyade catalytique PG-Histidine qui devrait faciliter la déprotonation du groupement hydroxyle nucléophile de l'accepteur DAG. En parallèle, des études de modélisation, réalisées par Olga Makshakova, ont complété les résultats obtenus en monocouches, lors de ma thèse. Ces résultats sont également présentés dans l'article.

III. Publication

Mechanism of activation of plant monogalactosyldiacylglycerol synthase 1 (MGD1) by phosphatidylglycerol

**Milène Nitenberg¹, Olga Makshakova², Joana Rocha¹, Serge Perez¹, Éric Maréchal³,
Maryse. A. Block³, Agnès Girard-Egrot^{4*}, Christelle Breton^{1*}**

¹University Grenoble Alpes, Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), CNRS UPR 5301, Grenoble, France.

²Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

³Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (LPCV), UMR 5168, CNRS, CEA, INRA, University Grenoble Alpes, BIG, Grenoble France.

⁴University of Lyon, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS), UMR 5246, CNRS, Univ. Lyon 1 5246, GEMBAS team, Villeurbanne, France.

*co-corresponding authors

Correspondence: University of Lyon 1, ICBMS, UMR CNRS 5246, GEMBAS team, Bât. Lederer, 1 rue Victor Grignard, 69622 Villeurbanne cedex, France. E-mail: agnes.girard-egrot@univ-lyon1.fr

Correspondence: CERMAV-CNRS, CS40700, 38041 Grenoble cedex 9, France. E-mail: christelle.breton@cermav.cnrs.fr

Running title: MGD1 activation by phosphatidylglycerol

Abbreviations:

AFM, atomic force microscopy; DAG, diacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; IEM, inner envelope membrane; LB, Langmuir-Blodgett; MGD1, monogalactosyldiacylglycerol synthase type 1; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; MIP, maximum insertion pressure; PA, phosphatidic acid; PG, phosphatidylglycerol; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; UDP-Gal, uridine 5'-diphosphate- α -D-galactose; Π , surface pressure ; Π_e , equilibrium surface pressure; Π_i , initial surface pressure.

ABSTRACT

Mono- and digalactosyldiacylglycerol (MGDG and DGDG) are essential galactolipids for the biogenesis of plastids and functioning of the photosynthetic machinery. In *Arabidopsis*, the first step of galactolipid synthesis is catalyzed by MGD1, a monotopic protein located in the inner envelope membrane of chloroplasts, which transfers a galactose residue from UDP-galactose to diacylglycerol (DAG). MGD1 needs anionic lipids such as phosphatidylglycerol (PG) to be active, but the mechanism by which PG activates MGD1 is still unknown. Recent studies shed light on the catalytic mechanism of MGD1 and on the possible PG binding site. Particularly, Pro189 was identified as a potential residue implied in PG binding, and His155 as the putative catalytic residue. In the present study, using a multifaceted approach (Langmuir membrane models, Atomic Force Microscopy, Molecular Dynamics), we investigated the membrane binding properties of native MGD1 and mutants (P189A and H115A). We demonstrated that both residues are involved in PG binding, thus suggesting the existence of a PG-His catalytic dyad that should facilitate deprotonation of the nucleophile hydroxyl group of DAG acceptor. Interestingly, molecular dynamics simulations showed that MGD1 induces a reorganization of lipids by attracting DAG molecules to create an optimal platform for binding.

Keywords: Atomic force microscopy, Langmuir monolayers, molecular dynamics, sulfoquinovosyldiacylglycerol

INTRODUCTION

A unique feature of chloroplast membranes is their high content of the uncharged galactolipids monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), which represent up to 80% of the total lipid content (Block *et al.*, 1983). Other lipids mostly consist of the anionic phosphatidylglycerol (PG) and sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG). MGDG and DGDG play an important role in photosynthesis, particularly in stabilizing photosystems protein complexes at the level of thylakoid membranes (Jones, 2007; Kobayashi, 2016; Mizusawa and Wada, 2012). Galactolipids are also key elements in determining the membrane architecture (Demé *et al.*, 2014; Gounaris and Barber, 1983; Gounaris *et al.*, 1986). Indeed, the MGDG/DGDG ratio in chloroplasts seems crucial for the functional integrity of the photosynthetic machinery and therefore must be tightly regulated (Dörmann and Benning, 2002; Rocha *et al.*, 2018).

Three functional MGDG synthases have been identified in Arabidopsis, denoted as MGD1, MGD2, and MGD3. They catalyze the transfer of a galactose residue from uridine 5'-diphosphate- α -D-galactose (UDP-Gal) to the *sn*-3 position of diacylglycerol (DAG) acceptor to form MGDG. MGD1 is the major isoform responsible for the synthesis of the bulk of MGDG (~50 % of total lipids) needed for the rapid and massive expansion of membrane thylakoids in response to light. MGD2 and MGD3 are mostly produced in non-photosynthetic tissues and more specifically, they are induced in response to phosphate shortage (Awai *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2007).

MGD1 is a monotopic membrane protein embedded in the outer leaflet of inner envelope membrane (IEM) (Miège *et al.*, 1999; Vojta *et al.*, 2007; Xu, 2005). The membrane binding properties of MGD1 are crucial for the enzyme function since it must bind to both the water-soluble donor sugar (UDP-Gal) and hydrophobic DAG acceptor substrates. The three-dimensional structure of MGD1, recently solved in its apo form and in complex with UDP, allows getting a more precise idea of its mode of action and its interaction with the membrane (Rocha *et al.*, 2016). MGD1 adopts the classical GT-B fold consisting in two Rossmann-type domains separated by a large cleft forming the catalytic site. The C-terminal domain corresponds to the nucleotide-sugar binding domain, while the N-terminal domain is very likely involved in the binding of the DAG acceptor. Structural data provide insight into the residues of the active site and led us to propose the histidine 155 (H155) residue as the catalytic base that deprotonates the nucleophile OH group of DAG. One of the peculiarities,

highlighted by the resolution of the structure, is the presence of a long and flexible region of nearly 50 amino acids in the N-terminal domain (not visible in the crystallographic structure) that is possibly involved in the capture of the DAG acceptor. Indeed, deletion of part of this region dramatically affected the rate of binding to DAG (Rocha *et al.*, 2016). The current model proposes that MGD1 is inserted into the bilayer essentially by its N-terminal domain via this flexible region.

MGD1 needs anionic lipids such as phosphatidylglycerol (PG) or phosphatidic acid (PA) to be active (Dubots *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2013). Intriguingly, PG and PA appear to proceed through different mechanisms and their effects are synergic, thus indicating distinct binding sites (Dubots *et al.*, 2010). PA acts as an allosteric activator of MGD1 and is also a precursor for DAG but current data give no indication on its potential binding site in the protein. In contrast to PA, PG behaves as a classical activator of MGD1 (Dubots *et al.*, 2010). Recently, it has been proposed that PG, which is abundant in plastid membranes (7-8 mol%), contributes to the anchoring of MGD1 at the membrane surface in specific sites where DAG may transiently accumulate (Rocha *et al.*, 2016). This assumption was substantiated by mutational studies indicating that PG binds to MGD1 in a region close to the DAG binding site. Specifically, point mutations of W287 and P189 to alanine resulted in loss of MGD1 activity in the presence of PG, whereas these mutants retain significant activity with PA (Dubots *et al.*, 2010).

The influence of lipid composition on MGD1 membrane binding was recently investigated using the Langmuir monolayer technique, which is particularly well adapted for monotopic membrane proteins (Sarkis *et al.*, 2014). The Langmuir technique was also used to demonstrate the role of the flexible region in the N-domain in DAG binding (Rocha *et al.*, 2016). MGD1 behave differently when tested with pure MGDG or DGDG monolayers. MGDG, its reaction product, exerts a positive effect on MGD1 binding, whereas DGDG has a negative effect and tends to exclude the protein. These opposite effects suggest that MGD1 localizes to specific MGDG-enriched micro-domains but they also highlighted the importance of the MGDG/DGDG ratio in maintaining the enzyme bound to the membrane. Electrostatic interactions also contribute significantly to MGD1 binding as demonstrated in tests with monolayers made of either PA or PG (Sarkis *et al.*, 2014). The effect was particularly pronounced with PG, which demonstrated high affinity for MGD1 and which was shown to counteract the negative effect of DGDG.

To synthesize MGDG, MGD1 needs in addition to its donor sugar UDP-Gal to have access to its DAG acceptor, which is characterized by the absence of a polar head group. Taking into account that the amount of DAG in plastid membranes is very low (less than 1 mol%) and that the flux of DAG must be strictly regulated to meet the high demand in galactolipids, we hypothesized that MGD1 binds in specific sites where DAG may accumulate. We also considered that PG, which is abundant in the IEM (8 mol%), could help MGD1 to trap its DAG substrate (Rocha *et al.*, 2016, 2018). This assumption was strengthened by the observation that MGD1 exhibited the fastest kinetics of adsorption on a DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer (Sarkis *et al.*, 2014).

In the present study, we aimed to better understand the role of PG, alone or in association with DAG, in MGD1 membrane binding. For this purpose, using a multifaceted approach combining biophysical (Langmuir experiments, Atomic Force Microscopy) and computational methods (Molecular Dynamics - Coarse Grain), we explored the binding properties of native MGD1 and two protein mutants (P189A and H155A) to various membrane models composed of pure PG or DAG or mixtures of both lipids at different molar ratios. A particular attention has been given to the residues involved in the interaction with the acceptor substrate (H155) on the one hand, and the PG phospholipid (P189) on the other hand, to give insights in the mechanism of activation of MGD1 by PG.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DAG (1-2-dioleoyl-sn-glycerol) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabama, US) and PG (L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol ammonium salt from egg yolk lecithin) from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). UDP-Gal was from Carbosynth (Compton - Berkshire - UK).

Lipid preparation

The solvents were of analytical grade (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The lipid mixtures were prepared at a concentration of 1 mM in chloroform and stored at -20°C under argon to prevent lipid oxidation.

Expression and purification of MGD1

The generation of the MGD1 catalytic domain protein construct comprising residues [137-533] fused to a His₆-tag at the C-terminus has been described previously (Rocha *et al.*, 2013). Briefly, this sequence was cloned into pET29b vector (Novagen Inc.) and the resulting plasmid was used to transform *E. coli* BL21(DE3) cells. Conditions of expression and purification of MGD1 were as previously described (Rocha *et al.*, 2013). The pure protein (10 mg/ml) in Bis-Tris buffer [25 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1 mM Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP), 5% Glycerol; pH 6.5] was stored at -20°C until use. Protein mutants H155A and P189A have been generated from the same plasmid using the QuickChange Site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, France). Mutant proteins were expressed and purified as the wild-type.

MGD1 activity assay

Enzyme activity was assayed in mixed micelles using a protocol adapted from (Rocha *et al.*, 2013). Enzyme assays were performed at room temperature in Bis-Tris buffer supplemented with 6 mM CHAPS, in the presence of either 1.5 mol% PG or PA, 6.3 mol% DAG, and 1 ng (PA tests) or 5 ng (PG tests) of enzyme in a final volume of 36.5 µl. The micellar surface concentration of lipids (expressed in mol%) relative to all mixed micelle components was used to express the lipid concentration. Reaction is initiated by addition of UDP-Gal (700 µM) and the release of UDP as a function of time is measured using the UDP-GloTM Glycosyltransferase Assay from Promega. The principle of the assay is to convert UDP to ATP to generate light in a luciferase reaction. Twenty-five µl of reaction mix are mixed with 25 µl of UDP Detection reagent in a 96-well microplate and after 1 hr-incubation at room temperature, the luminescence was read in a plate-reading luminometer (Spark 10M, Tecan). In our hands, the bioluminescent signal is proportional to UDP concentration in the range [0.01-0.8 µM]. Assays were done in triplicates and enzyme activity was expressed in nmol/mn/mg protein. Control reactions were performed in the absence of acceptor.

Langmuir experiments

Monolayers were prepared on a KSV 2000 Langmuir-Blodgett trough (three multi-compartments, KSV NIMA, Biolin Scientific, Finland) with a symmetric compression system.

The rectangular trough has a volume of 80 mL and a surface of 119.25 cm². A Wilhelmy plate was used to measure the surface pressure (π) with an accuracy of ± 0.5 mN/m. The trough was cleaned with ethanol, dichloromethane and ultrapure water successively, and filled with filtered Bis-Tris buffer. In our previous study (Sarkis *et al.*, 2014), buffer was composed of 50 mM MOPS, 23 mM K₂HPO₄, 23 mM KCL, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 2% glycerol pH 7.8, but this buffer as changed in the present study to be in the same composition as the protein buffer. The Bis-Tris buffer (pH 6.5) was found more suitable for the activity and stability of MGD (Rocha *et al.*, 2013). In addition, no significant differences were observed when MGD1 was tested on a PG monolayer with both buffers (data not shown). All experiments were performed at 25°C by maintaining the desired temperature with an Ecoline RE106 low-temperature thermostat (LAUDA, Germany).

The method of monolayer formation consisted of a drop of 15 μ L of the lipid mixture (1 mM in chloroform) gently spread at the air/buffer interface with a micro-syringe. After 15 minutes allowing solvent evaporation, the monolayer was compressed at different initial surface pressures Π_i (7.5, 10, 15, 20, 23, 25 mN/m) by two mobile barriers. After stabilization of the monolayer, the surface area was kept constant by stopping the movement of the mobile barriers and then, the protein was injected under the surface at a fixed and sub-saturating concentration (13 nM). This injection triggered the increase of the surface pressure to attain the equilibrium surface pressure, indicating the end of the adsorption process. The changes in surface pressure ($\Delta\Pi$) induced by the interaction of proteins with the monolayer were recorded continuously, as a function of time, with a computer-controlled Langmuir film balance KSV NIMA (Biolin Scientific, Finland). Each experiment was repeated at least three times for each set of conditions.

Determination of the binding parameters of MGD1

The parameters that characterize the binding of MGD1 to different membranes were assessed as previously described (Sarkis *et al.*, 2014). The plot of the maximal surface pressure increase ($\Delta\Pi_{\max}$) as a function of Π_i allows the determination of the maximum insertion pressure (MIP) and the $\Delta\Pi_0$ values by extrapolating the regression of the plot to x and y axes, respectively. The synergy factor (α) was obtained by adding 1 to the slope of the plot (Boisselier *et al.*, 2012). The uncertainties on MIP and the synergy factor α , were determined as previously described (Boisselier *et al.*, 2012; Calvez *et al.*, 2011). The uncertainty on MIP was calculated with a 95%

confidence interval from the covariance of the experimental data for the linear regression. These experimental errors were directly determined with the free binding parameters calculator software (<http://www.crchudequebec.ulaval.ca/BindingParametersCalculator>) developed by Salesse's group. The differential Π_0 ($d\Pi_0$) parameter was calculated as follows: $d\Pi_0 = \Delta\Pi_0 - \Pi_e$, where the $\Delta\Pi_0$ value reflects the insertion abilities of the protein in an uncompressed monolayer of lipids, and Π_e is the surface pressure increase at the equilibrium obtained with the protein in absence of lipids (Nasir *et al.*, 2017).

Atomic Force Microscopy (AFM)

The same KSV 2000 Langmuir-Blodgett trough (three multi-compartment system, KSV NIMA, Biolin Scientific, Finland) with a symmetrical compression system was used to measure the surface pressure and prepare AFM samples by the way of Langmuir-Blodgett (LB) technique. After stabilization of the surface pressure, the Langmuir film was transferred to freshly cleaved mica plates by vertically raising (1 mm/min) the mica through the lipid/liquid interface maintained at constant surface pressure of 15 mN/m. AFM images of LB films were obtained in tapping mode using a Pico-plus atomic force microscope (Agilent Technologies, Phoenix, AZ, USA), under ambient conditions with a scanning area of $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Topographic images were acquired using silicon nitride tips on integral cantilevers with a nominal spring constant of 1.45-15.1 N/m and a frequency between 87-230 kHz. Representative images were obtained from ≥ 2 samples prepared on different days and from ≥ 3 macroscopically separated areas on each sample.

Molecular dynamics simulations

The initial structure of DAG-PG bilayer was built using the CHARMM-GUI online service (Qi *et al.*, 2015) in the proportion 1:3. In the initial system, both leaflets of the bilayer were symmetric. The corresponding membrane in water box without protein was calculated as a reference, the box of $21.5 \times 21.5 \times 7.3$ nm size contained 1200 PG and 400 DAG molecules, 11988 water molecules and 1349 Na^+ and 149 Cl^- atoms. The 3-dimensional structure of MGD1 was taken from the reported X-ray solved structure (PDB code: 4WYI) (Rocha *et al.*, 2016). The long and flexible region in the N-domain of MGD1, not visible in the crystal structure, was constructed *de novo* using online service i-Tasser (Roy *et al.*, 2010). In the initial

system, both leaflets of the bilayer were symmetric except for the elimination of several lipid molecules to compensate the partial protein burying into the membrane. The initial orientation of the protein to the bilayer was set using the OPM service which minimizes the energy for transferring the hydrated protein to the membrane (Lomize *et al.*, 2012). The composition of the macromolecular system was: 1190 PG molecules and 393 DAG molecules, one MGDG1 protein, 28151 water molecules. The electrostatic neutralization required the addition of 1502 Na⁺ and 324 Cl⁻ atoms. An overall salt concentration of approximately 150 mM (excluding counter ions) was obtained. The initial size of the macromolecular system was 21.5×21.5 in the lateral (x, y) dimensions and 11.8 nm in the z dimension at the start of the simulation.

The molecular dynamics (MD) calculations were performed at the Coarse-Grain level of approximation with Martini 2.2 parameters (Marrink *et al.*, 2007) using GROMACS 5.1 (Van Der Spoel *et al.*, 2005). The systems were energy-minimized with the steepest descent algorithm within 10000 steps. Then followed five periods of equilibration (each for 1 μs) which were performed using a leapfrog integrator using appropriate time steps (ranging from 2 to 20 fs) and gradual decrease on restraints of the position of the lipid head groups. The production phase was carried out without any restraints, using time step of 20 fs. The temperature of the macromolecular system was kept at 298 K by a velocity rescale coupling algorithm with 2.0 ps time constant. The pressure was kept at 1 bar using Berendsen barostat with 2.0 ps coupling constant and a compressibility of 3×10^{-4} bar. The total length of the trajectory was 6 μs. For the analysis of averaged properties of the equilibrated membrane the last 4 μs were considered. The post-processing analysis was performed using the analytical tools implemented in GROMACS.

RESULTS

We aimed to better understand the interaction of MGD1 with lipid monolayers formed at the air/liquid interface with either pure DAG (acceptor substrate) or PG (activator), or mixtures of both lipids used at different molar ratios [DAG-PG (1:3 mol/mol) or DAG-PG (3:1 mol/mol)]. The Langmuir monolayer technique was chosen for its simple experimental design and its suitability for studying the insertion of monotopic membrane proteins like MGD1 (Sarkis *et al.*, 2014). In addition to native MGD1, two protein mutants (designated P189A and H155A)

were included in the study. Proline 189 has been identified as a residue possibly interacting with PG and histidine 155 was proposed as the catalytic base for the transfer reaction (Dubots *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2016). These two residues were mutated into alanine, a substitution that is expected to preserve native protein structure and that does not introduce unwanted steric or electrostatic effects. The three proteins were purified to homogeneity using a two-step procedure (Rocha *et al.*, 2013) and their enzyme activities were determined using the bioluminescent UDP-Glo™ Glycosyltransferase assay from Promega. This assay was found appropriate and very sensitive to monitor MGD1 activity and it can replace advantageously the classical radioactivity-based assay that was used so far (Rocha *et al.*, 2013). We therefore checked that MGD1 showed no activity in the absence of an anionic lipid and greater activity in the presence of PA (1230 +/- 90 nmol/min/mg protein) compared to PG (482 +/- 21 nmol/min/mg protein). We confirmed that the mutant H155A is totally inactive in the presence or absence of anionic lipids, and that the mutant P189A is inactive in the presence of PG and retained significant activity in the presence of PA (approximately 50% of the wild type enzyme). SQDG was also tested as a possible MGD1 activator since it was previously shown to greatly stimulate MGDG synthesis activity using a solubilized and partially purified enzyme extract from spinach chloroplast envelope membranes (Covés *et al.*, 1988). In our tests, SQDG demonstrated the same capability to activate MGD1 as did PG and PA (891 +/- 30 nmol/min/mg protein). Interestingly, the P189A mutant was totally inactive in the presence of SQDG thus suggesting a similar binding site for PG and SQDG.

Interfacial behavior of MGD1 and mutants at an air/buffer interface

We characterized the surfactant properties of MGD1 and its mutants by evaluating their interfacial behavior at the air/buffer interface and without lipids. After injection of the protein under a nude interface, the adsorption of the protein at the air/buffer interface was monitored by continuous measurement of the surface pressure increase (Π) as a function of time until the equilibrium value, Π_e , was reached. This surface pressure variation is directly proportional to the surfactant properties of the protein (Pitcher *et al.*, 2002; Sarkis *et al.*, 2011). The same Π_e value was obtained for the three proteins, around 14-15 mN/m (Fig. 1A), indicating that the point mutations did not change significantly their surfactant properties and that these proteins behaved similarly at the air-liquid interface.

Adsorption of MGD1 and mutants in an uncompressed monolayer of lipids: differential Π_0 ($d\Pi_0$) parameter

It is possible to use the recently defined parameter, the differential Π_0 ($d\Pi_0 = \Delta\Pi_0 - \Pi_e$), to evaluate the influence of the presence of lipids on the interfacial adsorption of the proteins at null surface pressure (uncompressed interface) (Nasir *et al.*, 2017). A positive $d\Pi_0$ value is indicative of an attractive effect of the lipids on the molecule adsorption onto the monolayer, whereas a negative $d\Pi_0$ value indicates an unfavorable impact. The $\Delta\Pi_0$ values have been determined from plots of the maximum surface pressure increase ($\Delta\Pi$) as a function of Π_i using a DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer (Fig. 1B). For MGD1 and mutants, the $d\Pi_0$ values were positive, suggesting an attractive effect of the lipids on the interfacial adsorption of these different proteins with a significantly higher $d\Pi_0$ value for the two mutants (H155A $d\Pi_0=7.65\pm 0.8$ mN/m, P189A $d\Pi_0=8.91\pm 0.6$ mN/m) compared to native MGD1 ($d\Pi_0=5.23\pm 0.9$ mN/m) (Fig. 1C). Therefore, the uncompressed lipids attracted a little bit more mutants than the native enzyme. One plausible explanation is that mutations led to subtle conformational changes that either modified the amphiphilic balance of the protein which exposed differently hydrophobic/hydrophilic areas (i.e. H155A), or locally destructured the protein somewhat (i.e. P189A). Similar results were obtained with the other monolayers used in this study (data not shown).

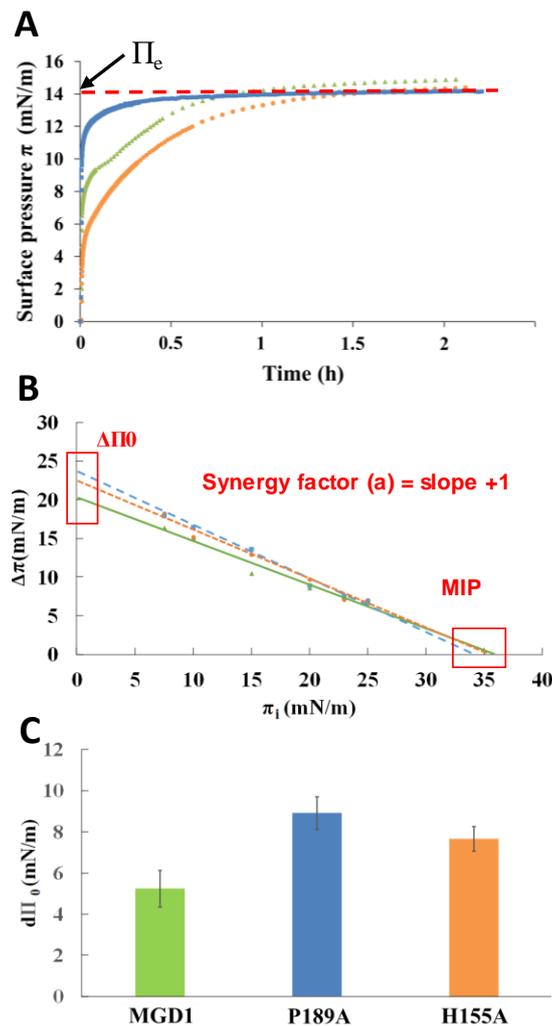


Figure 1: Adsorption of native MGD1, P189A and H155A mutants at the air/liquid interface in the absence and in the presence of lipids.

A) Kinetics of adsorption of MGD1 (green), P189A (blue) and H155A (orange) mutants (each at 13 nM) at a nude air/liquid interface, after injection of proteins into the subphase at 25°C.

B) Adsorption of the native protein MGD1, P189A and H155A mutants to a DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer. Variation of surface pressure ($\Delta\Pi$ in mN/m) when proteins interacted with the monolayer at different initial surface pressure (Π_i). This representation allowed determining MIP, $\Delta\Pi_0$, and synergy factor (a) values.

C) Differential $d\Pi_0$ for the native and mutant proteins, calculated as follows: $d\Pi_0 = \Delta\Pi_0 - \Pi_e$ (Π_e being the plateau value determined in panel A).

Membrane binding properties of MGD1 and mutants on DAG and/or PG monolayers

The plots of the maximum of surface pressure increase ($\Delta\Pi$) measured upon injection of the protein at a fixed and subsaturating concentration under the monolayer, as a function of the initial pressure Π_i (from 7.5 to 25 mN/m) allowed for determining two other important binding parameters: the maximum insertion pressure (MIP) and the synergy factor a (slope + 1) (Fig. 1B). MIP corresponds to the surface pressure beyond which no adsorption can occur and provides information about the insertion ability of the molecule into a lipid membrane. If the MIP value is larger than the estimated membrane lateral pressure (~ 30 mN/m) in natural biological membranes (Marsh, 1996), there is a significant interaction between the protein and the monolayer (Calvez *et al.*, 2009). The synergy factor a highlights the protein preference for a monolayer (Calvez *et al.*, 2011). A positive a value is indicative of a favorable interaction between the protein and monolayer, a negative value indicates repulsion, and a null synergy factor corresponds to a stationary state (with no favored or disfavored binding). Different monolayers were tested: pure DAG and PG monolayers and a DAG-PG mixture at 1:3 or 3:1 molar ratios. Figure 1B shows one example of plots obtained for MGD1 and mutants on a DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer. Table 1 gives the MIP and a values obtained for MGD1 and mutants with the four different monolayers tested. The best MIP and a values for MGD1 and the two mutants were obtained for the DAG-PG (3:1) monolayer and to a lesser extent for the DAG monolayer. This is particularly true for P189A that demonstrated the highest values (MIP = 48.7 ± 3.6 mN/m; $a = 0.56 \pm 0.02$) compared to native MGD1 (MIP = 40.4 ± 1.6 mN/m; $a = 0.5 \pm 0.02$), a phenomenon that can probably be attributed to a better $d\Pi_0$ for this mutant. The H155A mutant behaved similarly as native MGD1 on DAG-PG (3:1) (MIP = 40.7 ± 3.5 mN/m; $a = 0.46 \pm 0.04$) but showed significant lower a value on DAG monolayer ($a = 0.4 \pm 0.13$), which is consistent with its role as catalytic base. Except a slight preference for DAG-PG (3:1), the native enzyme did not show significant differences for the three other monolayers, with a MIP value around 36-37 mN/m and a synergy factor in the range 0.44 to 0.5.

Marked differences were observed between mutants and native enzyme when tested on pure PG monolayer. As expected, P189A mutant exhibited lower affinity towards PG as compared to MGD1. The MIP and a values decreased to 30.9 ± 0.09 mN/m and 0.2 ± 0.02 , respectively, for the P189A mutant compared to MGD1 (MIP = 35.9 ± 3.6 mN/m; $a = 0.43 \pm 0.05$). The 2-fold decrease of the synergy factor confirmed that the P189 residue is involved in PG binding. The most striking result came from the H155A mutant, which showed the lowest MIP

and α values for PG monolayer (MIP = 28.2 ± 0.7 mN/m and $\alpha = 0.1 \pm 0.02$). Unexpectedly, these results suggested that H155 also interacts with PG. The results obtained with a PG-enriched DAG-PG (1:3) monolayer confirmed this assumption. The MIP values were roughly similar for the three proteins (36.2 ± 3.7 mN/m, 35.1 ± 2.6 mN/m and 34.5 ± 1.9 mN/m for MGD1, H155A and P189A, respectively). However, the α values of mutants (0.36 ± 0.04 and 0.33 ± 0.03 for H155A and P189A, respectively) were smaller compared to MGD1 (0.44 ± 0.05) and, moreover, they were intermediate between those obtained with PG and with DAG-PG (3:1). Altogether, these results confirmed the previously proposed roles for P189 and H155 residues (Rocha *et al.*, 2016) and revealed a new and unexpected interaction between H155 and PG.

		DAG	DAG-PG (3:1)	DAG-PG (1:3)	PG
MGD1	MIP	37.3 ± 9.8	40.4 ± 1.6	36.2 ± 3.7	35.9 ± 3.6
	α	0.51 ± 0.11	0.5 ± 0.02	0.44 ± 0.05	0.43 ± 0.05
H155A	MIP	34 ± 7.4	40.7 ± 3.5	35.1 ± 2.6	28.2 ± 0.7
	α	0.4 ± 0.13	0.46 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.1 ± 0.02
P189A	MIP	42.7 ± 5.0	48.7 ± 3.6	34.5 ± 1.9	30.9 ± 0.9
	α	0.49 ± 0.05	0.56 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.2 ± 0.02

Table 1: **Influence of the lipid nature on protein interactions.** MIPs values (mN/m) and synergy factor α were determined for native MGD1 and the mutants H155A and P189A, for different lipid monolayer compositions.

Organization of MGD1 and mutants on DAG and/or PG monolayers

In order to complete our study on the binding parameters, AFM was used to image, at the mesoscopic scale, MGD1 and mutants inserted into DAG, DAG-PG (1:3), or PG monolayers. Experiments were done at initial surface pressure of 15 mN/m that was previously shown to be the most favorable Π_i value for studying MGD1 binding (Sarkis *et al.*, 2014).

In absence of protein, the monolayers transferred onto mica showed homogenous films with no visible phase separation (Fig. 2, insets in panels A, D and G). Comparison of control AFM images with those obtained in the presence of native MGD1 revealed bright

patches that are particularly visible and uniformly distributed on the DAG-PG (1:3) monolayer (Fig. 2A). These bright patches can be attributed to protein or protein/lipid complexes (or aggregates) embedded in a darker matrix corresponding to the lipid monolayer. In the case of DAG monolayer, the size of these clusters are even larger (Fig. 2G). In contrast, MGD1 adsorbed homogeneously on PG monolayer with no apparent protein aggregation (Fig. 2D). The P189A mutant behaves similarly as the native enzyme on PG (Fig. 2E) and DAG-PG (Fig. 2B) monolayers, although in the latter case protein clusters tend to be smaller. However, its behavior is distinct from MGD1 on DAG monolayer (Fig. 2H) in that images showed no bright patches, but instead, homogeneous distribution as observed on PG. Images obtained with H155A mutant presented a few differences. Bright clusters were evidenced for the three types of monolayers, more noticeably on DAG-PG (Fig. 2C, F, and I). However, this mutant seemed to induce a reorganization of the monolayer that was not observed with the P189A mutant nor with MGD1. The accumulation of protein underneath the membrane induced the formation of holes that correspond to dark spots clearly visible on DAG-PG and PG monolayers (Fig. 2C and F). This effect is absent on DAG monolayer (Fig. 2I).

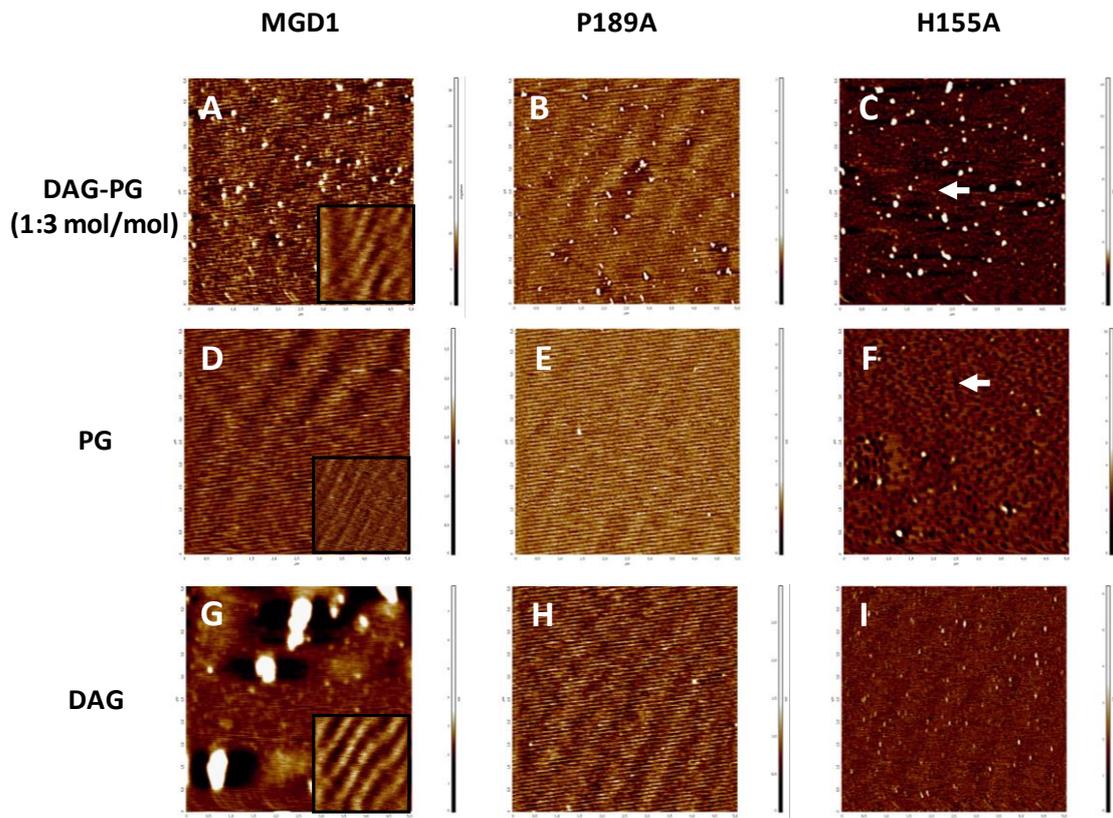


Figure 2: Influence of the lipid nature on the organization of MGD1, H155A and P189A mutants in the membrane. AFM topographic images of transferred protein/lipids films after protein adsorption on the lipid monolayers at an initial surface pressure Π_i of 15 mN/m. Insets in A, D, G: controls corresponding to the monolayer alone transferred on mica. White arrows in C and F indicate dark spots (holes). In all images, scan size is $5 \times 5 \mu\text{m}^2$.

Interaction of MGD1 with PG and DAG by computer modeling

Using Molecular Dynamics simulation, in the Coarse-Grain approximation, we investigated the interactions of MGD1 with a DAG-PG bilayer (at molar ratio 1:3) at the nanoscale level (Fig. 3A). During the whole trajectory, the protein remained tightly bound to the bilayer surface (but it undergoes internal motions of its N- and C-domains *vide supra*). The most striking feature is the observation that the overall set of interactions between MGD1 and the lipids induces a significant clustering of DAG molecules. Without protein, DAG and PG are well mixed, as indicated by the number of contacts between these lipids in the membrane: 80% for DAG and 33% for PG, (in agreement with 75% and 25% that derived from their respective composition in the membrane). The presence of MGD1 induces a reorganization of the lipids

that results in a higher local concentration of DAG molecules, which assembles in the form of clusters. Such a clustering effect is clearly illustrated by the number of contacts of MGD1 with DAG and PG. On average, there are 31 ± 8 DAG molecules interacting with MGD1, whereas this number amounts to 12 ± 4 for PG molecules. A snapshot from the trajectory given in Fig. 3B illustrates the location of PG and DAG molecules with respect to the protein. The finding that MGD1 induces a local concentration of DAG molecules in its vicinity is in agreement with experimental data showing favored binding of the protein when the concentration of DAG is high (Table 1).

During the course of the simulation, we observed intramolecular motions within MGD1 involving the two Rossmann-type domains corresponding, respectively, to the N- and C-moieties of the protein. While the N-domain always remains anchored in the membrane, the C-domain experiments excursions that brings it in the vicinity of the membrane (Fig. 3C). At this position, the interactions between both surface groups of C-domain and residues of the catalytic site with PG molecules become possible. Then the protein returns to the initial position. The exchange between the two orientations of the protein occurs within 1 μ s. This observation pertains to the dynamics of the relative positions of the two key residues P189 and H155 and their interactions with PG. P189 is located in the N-domain on the long and flexible modeled loop, which is buried into the membrane. The catalytic residue H155 also belongs to the N-domain and it is located in the large cleft which hosts the active site (Fig. 3A). The distance between these two residues is 20 Å and it remains constant during the trajectory. In the initial state, H155 is remote from the membrane surface and there are no lipid molecules within a 8 Å distance (this corresponds to the first solvation shell in the Martini model and was used as a cut-off). Therefore, the interactions of P189 with PG molecules are possible due to the location of this residue within the membrane while the constraint for H155 to interact with PG requires the approach of C-domain to the membrane surface. The oscillations between the orientations of the C-domain with respect to the membrane surface would explain part of the reaction mechanism. Besides entrapping PG and DAG, MGD1 needs to entrap the UDP-Gal donor and then release UDP. The change in protein orientation with respect to the membrane could provide the switch between two processes, i.e. binding of hydrophilic donor substrate and of hydrophobic acceptor substrate.

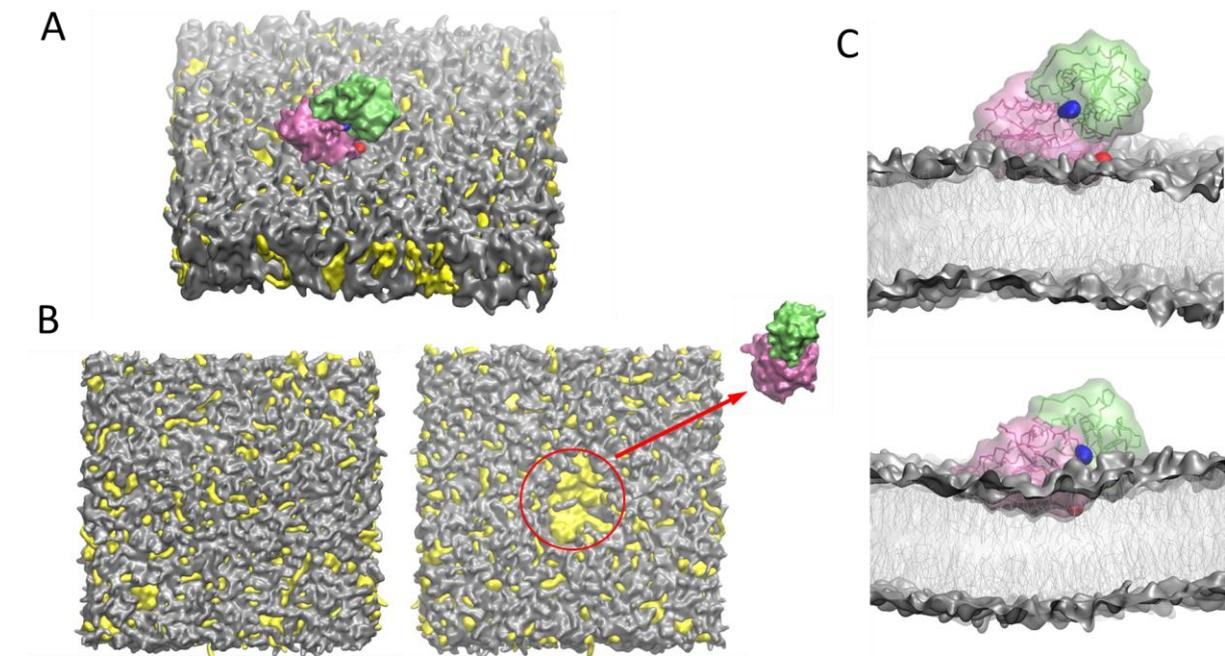


Figure 3: Three-dimensional depictions of the macromolecular assembly showing the interaction of MGD1 with a DAG-PG bilayer (1:3 mol/mol) in QuickSurf representation. Color coding: PG (grey), DAG (yellow), N-domain of MGD1 (magenta), C-domain of MGD1 (green), P189 residue (red), H155 residue (blue). **A)** An overall view of the assembly comprising MGD1, 1190 PG, 393 DAG, 28151 H₂O, 1502 Na⁺ and 424 Cl⁻. **B)** View in the membrane plane of the bilayer without protein (left) and with bound MGD1 (right) showing the local concentration of DAG in the vicinity of the protein, which location is indicated by red circle and its orientation in relation to the membrane is given apart. **C)** Two representative orientations of MGD1 with respect to the membrane plane showing the position of H155 away from the membrane (top) and close to the membrane surface (bottom) as a result of the dynamics of internal motions of C- and N-domains of MGD1.

DISCUSSION

In Arabidopsis, MGD1 is a key enzyme in the biogenesis of chloroplast membranes to provide the bulk of galactolipids needed for the massive expansion of thylakoids. This MGDG synthase has been extensively studied at the physiological, biochemical and structural levels (for a review see, (Rocha *et al.*, 2018)). MGD1 is a monotopic membrane protein embedded in the IEM, which requires anionic lipids such as PG or PA to be active (Dubots *et al.*, 2010). Kinetics

data indicated that PG and PA proceed through different mechanisms and probably have distinct binding sites. The recent 3D structure of MGD1 shed light on the catalytic mechanism and highlighted the role of H155 as the catalytic base. It also pointed out the importance of a large and flexible loop in DAG binding (Rocha *et al.*, 2016). However, structural data did not reveal the role of anionic lipids in catalysis. Previous studies, based on the use of Langmuir membrane model, showed that the lipid composition has an influence on the membrane binding properties of MGD1 (Sarkis *et al.*, 2014). MGD1 demonstrated high affinity for its DAG substrate, as expected, but also for PG and PA. Particularly, MGD1 showed the highest rate of binding for a DAG-PG lipid combination. The role of PA in MGD1 regulation is of paramount importance in a physiological context since it is an allosteric activator of MGD1 and also a central metabolite in the glycerolipid metabolism pathway (Dubots *et al.*, 2011). Unfortunately, adding PA to a DAG monolayer generated instability that makes results difficult to interpret. We therefore focused our study on the interplay between PG, DAG and MGD1 with the aim to unravel the role of PG as MGD1 activator. We took advantage of the identification of a particular amino acid residue in MGD1, P189, possibly involved in PG binding (Dubots *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2016) to explore its impact on the interaction of MGD1 on various membrane models. In addition, this proline residue is located in the large and flexible region that was proposed to be essential to trap the DAG acceptor (15).

In the present study, we investigated the influence of the lipid composition on the ability of MGD1 and of two protein mutants, P189A and H155A, to interact with a membrane. To this end, we used Langmuir monolayers as biomimetic membrane models, composed of either DAG or PG or a combination of both lipids, to better understand the effects of the one-point mutation on the membrane anchoring process. The mutation of these two amino acids into alanine, which was expected not to alter significantly the protein conformation, did not change the surfactant properties of mutant proteins determined at the air/buffer interface (Fig. 1A). However, the presence of the lipid acyl chains (*i.e.* hydrophobic environment), at null surface pressure (uncompressed interface), exerted better attractive effect on the interfacial protein adsorption of mutants, as shown by the determination of the differential parameter $d\Pi_0$ (Fig. 1C). This suggests that the protein amphiphilic balance was modified by subtle conformational changes induced by mutations, and therefore, any decrease in the values of the binding parameters (MIP and synergy factor α) can be interpreted as a loss of the interaction capabilities of the mutants with the membrane.

The native MGD1 showed a similar behavior with the four monolayers tested (Table 1) with MIP values ranging from 36 to 40 mN/m and synergy factors from 0.43 to 0.51, confirming its high affinity for these lipid species (Sarkis *et al.*, 2014). The P189A mutant was considered to behave similarly as the native enzyme on DAG and DAG-PG (3:1). However, the affinity of this mutant decreased significantly when tested on pure PG, with a 2-fold decrease of the synergy factor. Interestingly, an intermediate value was obtained when using a DAG-PG with inverted molar ratio (1:3). These results undoubtedly support the involvement of P189 residue in PG binding. The H155A mutant was included in the study to corroborate its role as the catalytic base. This mutant displays no catalytic activity, which is consistent with its proposed role (Rocha *et al.*, 2016). As expected, this mutant demonstrated less affinity (lower α value) for DAG and DAG-PG (1:3) monolayers compared to the wild type enzyme. This effect was less pronounced for DAG-PG (3:1). Surprisingly, the affinity of H155A mutant towards PG dropped drastically with a synergy factor close to 0, suggesting a stationary state without any favoured or disfavoured interaction for protein binding. Adding DAG to the PG monolayer (1:3 molar ratio) restored affinity to some extent. These results suggest that His155 effectively interacts with PG and that this electrostatic interaction is a major contributor to MGD1 binding onto PG membrane.

Although MGD1 demonstrated similar binding parameters for the various monolayers, the native enzyme organized differently at the membrane interface depending on the lipid nature (Fig. 2). Homogenous binding was observed in the presence of PG with no visible protein clusters on AFM images. By contrast, the presence of DAG favoured the formation of protein-protein interactions, and the formed complexes were particularly large on pure DAG monolayer. The P189A mutant has a similar high affinity for DAG binding but it lost its capacity to form large protein aggregates. This proline residue is located in the N-domain, in a region that was previously proposed to interact with the membrane (Rocha *et al.*, 2016). Point mutation of this residue presumably changed locally the conformation of the polypeptide chain, which became less constrained, and incidentally, impacted its propensity to form protein clusters. The mutation of H155 into alanine was not expected to alter significantly protein organization. On DAG monolayer, H155A mutant also lost its capacity to form large aggregates and this was attributed to its lower affinity for its acceptor substrate. However, AFM images showed that this mutant induced a reorganization of the monolayers in the presence of PG, with the formation of holes suggesting a phenomenon of lipid segregation due to a probable exclusion of PG molecules.

Extension of the results derived from lipid monolayers could be achieved throughout the extensive molecular modeling simulation performed on a bilayer membrane, which may have more biological relevance. Over the course of the MD simulation we did not observe any membrane curvature, thus allowing a direct comparison of results of the simulation with experimental data obtained on a flat lipid monolayer. Upon the course of the simulation, we observed an increase of the local concentration of DAG molecules in the vicinity of the protein, which is the result of the interactions between residues at the protein surface and the glycerol moiety of DAG. This provides an explanation of the well-distributed protein patches observed on DAG-PG (1:3) monolayer (Fig. 2A). This also suggests an ordering of membrane lipids *in vivo* with DAG clustered by MGD1. It will be of interest to investigate whether other local membrane reorganization might occur with other lipids, in particular PA, and how this affects other DAG-using enzymes such as SQDG synthase.

The molecular dynamics simulation offers an extension of the motions that happen in the proteins and its surrounding over a time scale in line with those generally observed for such reaction mechanism. In particular, we observed spatial oscillations of the C-domain of MGD1 with respect to the membranes which is accompanied by a concerted motion that brings the H155 residue of active site close to membrane surface for the recruitment of PG. Therefore, the interactions of P189 with PG molecules are possible due to the location of this residue within the membrane. As such, we provide a structural information explaining the key role played by H155 and P189 in binding PG. But besides entrapping PG and DAG, MGD1 needs to entrap the UDP-Gal donor and then release UDP. The change in protein orientation with respect to the membrane could provide the switch between two processes, i.e. binding of hydrophilic donor substrate and of hydrophobic acceptor substrate.

Based on the present data, a new reaction mechanism for MGD1 is proposed that gives insight into the role of the enzyme activator PG. Enzyme reaction is suggested to occur in a single displacement S_N2 mechanism, with formation of an oxocarbenium-ion transition state assisted by a catalytic base (H155) (Rocha *et al.*, 2016). In this model, PG binds to the active site where it is stabilized by interactions involving P189 and H155 (Fig. 4). This creates an acid-base charge relay system, in the form of a PG-His dyad that should facilitate deprotonation by H155 of the OH group of DAG acceptor. Such acid-base dyads (involving a Glu or Asp instead of PG) have been described in some bacterial glycosyltransferases (for a review, see (Breton *et al.*, 2012)). This model also implies that a DAG molecule co-localizes with

a PG molecule, thus strengthening the hypothesis that the large flexible region in the N-domain contributes to both the anchoring of MGD1 to the membrane and to the capture of PG and DAG.

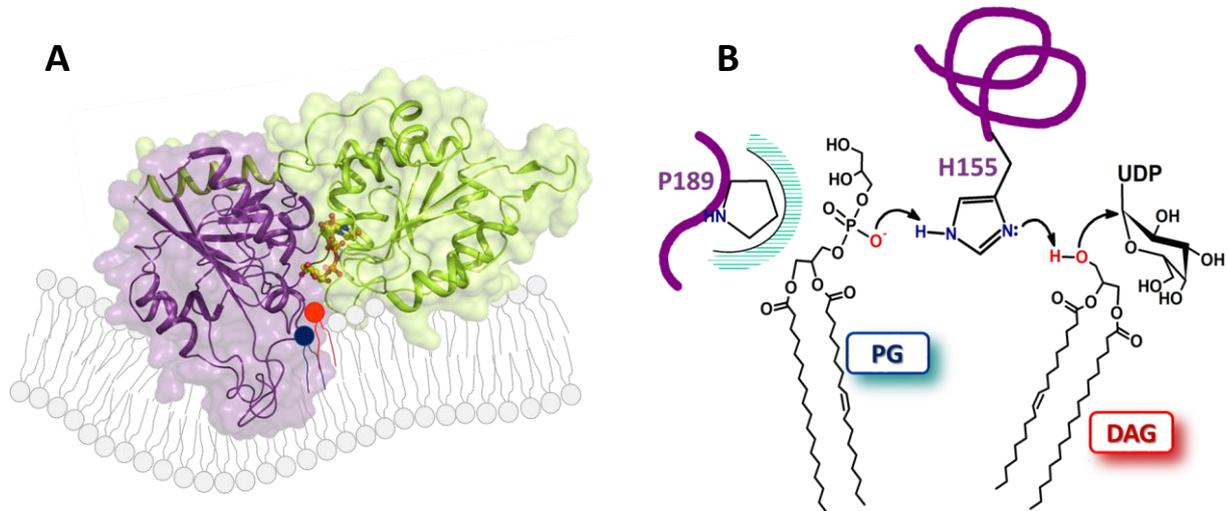


Figure 4: Proposed model for MGD1 membrane binding and reaction mechanism. **A)** MGD1 is partly embedded in the bilayer through its large and flexible region in the N-domain, which seems essential to the capture of DAG (shown in red) and PG (in blue) molecules. **B)** Schematic representation of MGD1 active site showing the PG-His catalytic dyad capable of deprotonating OH group of DAG acceptor. Reaction occurs through a S_N2 mechanism.

At the time of writing, we found no example in the literature of a similar catalytic dyad involving a negatively charged lipid. Other anionic lipids can fulfil the same role as PG. SQDG, which is another important component of chloroplast membranes (~10% of total lipids), can also activate plant MGDG synthases ((Covés *et al.*, 1988), this study). Kinetic analysis of P189A demonstrated that the mutant is inactive in the presence of SQDG, suggesting that this sulfolipid binds to the same site as PG. Our model raises the issue of the mechanism of activation of MGD1 by PA since it is expected to bind to a distinct site (Dubots *et al.*, 2010). Our hypothesis is that PA, which has a small polar head compared to PG and SQDG, can bind to the active site but in a different way, making no direct interaction with P189 but maintaining hydrogen bonding to His155. One cannot exclude the possibility of a second binding site for PA, which would be a regulator site, thus explaining the allosteric behaviour of PA.

PG is described as an essential component in structures and functions of photosystems (for a recent review, see (Kobayashi *et al.*, 2017)). In addition, PG and SQDG appear to be functionally redundant in plant chloroplasts and their respective levels are adjusted to maintain total anionic lipid content (~ 15%). We herein demonstrated the importance of PG in membrane binding and reaction mechanism of MGD1, which is a central enzyme in the biogenesis of chloroplast membranes (Rocha *et al.*, 2018). It remains to be determined, in a physiological context, which anionic lipid (SQDG or PG) will be the preferred MGD1 activator.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency (ANR-10-Blan-1524 ReGal, ANR-13-BSV8-0011); Université Grenoble Alpes (AGIR 2015); and Communauté Université Grenoble Alpes (Cross-Disciplinary project Glyco@Alps).

Author Contributions

C. Breton, A. Girard-Egrot, S. Perez, M.A. Block, E. Maréchal designed research; M. Nitenberg, O. Makshakova, J. Rocha performed research; all authors analyzed data; C. Breton, M. Nitenberg, A. Girard-Egrot, S. Perez wrote the paper.

REFERENCES

- Awai, K., Maréchal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H. and Joyard, J.** (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 10960-10965.
- Block, M.A., Dorne, A.-J., Joyard, J. and Douce, R.** (1983) Preparation and Characterization of Membrane Fractions Enriched in Outer and Inner Envelope Membranes from Spinach Chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **258**, 13281-13286.
- Boisselier, E., Calvez, P., Demers, E., Cantin, L. and Salesse, C.** (2012) Influence of the Physical State of Phospholipid Monolayers on Protein Binding. *Langmuir*, **28**, 9680-9688.
- Breton, C., Fournel-Gigleux, S. and Palcic, M.M.** (2012) Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 540-549.
- Calvez, P., Bussièrès, S., Demers, E. and Salesse, C.** (2009) Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie*, **91**, 718-733.
- Calvez, P., Demers, E., Boisselier, E. and Salesse, C.** (2011) Analysis of the Contribution of Saturated and Polyunsaturated Phospholipid Monolayers to the Binding of Proteins. *Langmuir*, **27**, 1373-1379.
- Covés, J., Joyard, J. and Douce, R.** (1988) Lipid requirement and kinetic studies of solubilized

- UDP-galactose:diacylglycerol galactosyltransferase activity from spinach chloroplast envelope membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4966-4970.
- Demé, B., Cataye, C., Block, M.A., Maréchal, E. and Jouhet, J.** (2014) Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J.* **28**, 3373-3383.
- Dörmann, P. and Benning, C.** (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 112-118.
- Dubots, E., Audry, M., Yamaryo, Y., Bastien, O., Ohta, H., Breton, C., Maréchal, E. and Block, M.A.** (2010) Activation of the Chloroplast Monogalactosyldiacylglycerol Synthase MGD1 by Phosphatidic Acid and Phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* **285**, 6003-6011.
- Dubots, E., Botté, C., Boudière, L., Yamaryo-Botté, Y., Jouhet, J., Maréchal, E. and Block, M.A.** (2011) Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie*, **94**, 86-93.
- Gounaris, K. and Barber, J.** (1983) Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in Nature. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 378-381.
- Gounaris, K., Barber, J. and Harwood, J.L.** (1986) The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *Biochem. J.* **237**, 313-326.
- Jones, M.R.** (2007) Lipids in photosynthetic reaction centres: Structural roles and functional holes. *Prog. Lipid Res.* **46**, 56-87.
- Kobayashi, K.** (2016) Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J. Plant Res.* **129**, 565-580.
- Kobayashi, K., Endo, K. and Wada, H.** (2017) Specific Distribution of Phosphatidylglycerol to Photosystem Complexes in the Thylakoid Membrane. *Front. Plant Sci.* **8**, 1-7.
- Kobayashi, K., Awai, K., Nakamura, M., Nagatani, A., Masuda, T., and Ohta, H.** (2009) Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant J.* **57**, 322-331.
- Lomize, M.A., Pogozheva, I.D., Joo, H., Mosberg, H.I. and Lomize, A.L.** (2012) OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* **40**, 370-376.
- Marrink, S.J., Risselada, H.J., Yefimov, S., Tieleman, D.P. and De Vries, A.H.** (2007) The MARTINI force field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 7812-7824.
- Marsh, D.** (1996) Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1286**, 183-223.
- Miège, C., Maréchal, E., Shimojima, M., Awai, K., Block, M.A., Ohta, H., Takamiya, K., Douce, R. and Joyard, J.** (1999) Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur. J. Biochem.* **265**, 990-1001.
- Mizusawa, N. and Wada, H.** (2012) The role of lipids in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 194-208.
- Nasir, M.N., Lins, L., Crowet, J.M., Ongena, M., Dorey, S., Dhondt-Cordelier, S., Clément, C., Bouquillon, S., Haudrechy, A., Sarazin, C., Fauconnier, M-L., Nott, K. and Deleu, M.** (2017) Differential Interaction of Synthetic Glycolipids with Biomimetic Plasma Membrane Lipids Correlates with the Plant Biological Response. *Langmuir*, **33**, 9979-9987.

- Pitcher, W. H., Keller, S. L. and Huestis, W.H.** (2002) Interaction of nominally soluble proteins with phospholipid monolayers at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta*, **1564**, 107-113.
- Qi, Y., Ingólfsson, H.I., Cheng, X., Lee, J., Marrink, S.J. and Im, W.** (2015) CHARMM-GUI Martini Maker for Coarse-Grained Simulations with the Martini Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 4486-4494.
- Rocha, J., Audry, M., Pesce, G., Chazalet, V., Block, M.A., Maréchal, E. and Breton, C.** (2013) Revisiting the expression and purification of MGD1, the major galactolipid synthase in Arabidopsis to establish a novel standard for biochemical and structural studies. *Biochimie*, **95**, 700-708.
- Rocha, J., Nitenberg, M., Girard-Egrot, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Block, M.A. and Breton, C.** (2018) Do Galactolipid Synthases Play a Key Role in the Biogenesis of Chloroplast Membranes of Higher Plants? *Front. Plant Sci.* **9**, 1-7.
- Rocha, J., Sarkis, J., Thomas, A., Pitou, L., Radzimanowski, J., Audry, M., Chazalet, V., de Sanctis, D., Palcic, M.M., Block, M.A., Girard-Egrot, A., Maréchal, E. and Breton, C.** (2016) Structural insights and membrane binding properties of MGD1, the major galactolipid synthase in plants. *Plant J.* **85**, 622-633.
- Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y.** (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**, 725-738.
- Sarkis, J., Hubert, J.F., Legrand, B., Robert, E., Chéron, A., Jardin, J., Hitti, E., Le Rumeur, E. and Vie, V.** (2011) Spectrin-like Repeats 11-15 of Human Dystrophin Show Adaptations to a Lipidic Environment. *J. Biol. Chem.* **286**, 30481-30491.
- Sarkis, J., Rocha, J., Maniti, O., Jouhet, J., Vie, V., Block, M.A., Breton, C., Marechal, E. and Girard-Egrot, A.** (2014) The influence of lipids on MGD1 membrane binding highlights novel mechanisms for galactolipid biosynthesis regulation in chloroplasts. *FASEB J.* **28**, 3114-3123.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E. and Berendsen, H.J.C.** (2005) GROMACS: Fast, flexible, and Free. *J. Comput. Chem.* **26**, 1701-1718.
- Vojta, L., Soll, J. and Bölter, B.** (2007) Protein transport in chloroplasts - targeting to the intermembrane space. *FEBS J.* **274**, 5043-5054.
- Xu, C., Fan, J, Froehlich, J.E., Awai, K. and Benning, C.** (2005) Mutation of the TGD1 Chloroplast Envelope Protein Affects Phosphatidate Metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 3094-3110.

IV. Résultats complémentaires non publiés

Un autre paramètre a été étudié durant ma thèse : la constante cinétique d'association k (s^{-1}) en fonction des différentes compositions de monocouches (DAG et/ou PG) et des différentes enzymes étudiées (MGD1, H155A, P189A). Plus cette valeur de k est élevée, plus la protéine s'insère rapidement dans la monocouche. Elle nous permet ainsi de déterminer quelle composition lipidique permet la meilleure insertion de la protéine dans la monocouche.

D'une façon générale, avec la monocouche DAG-PG (1:3 mol/mol), on remarque que plus la monocouche est compressée, plus les valeurs des constantes de vitesse d'adsorption k diminuent. Les résultats mettent en évidence que lorsque la pression initiale de surface est inférieure à 15 mN/m, les lipides qui sont alors peu comprimés, attirent les deux mutants (courbe orange et bleue) de manière un peu plus importante que MGD1 native (courbe verte). Ces résultats sont cohérents avec les analyses du $d\pi_0$ faites précédemment. A partir de 15 mN/m, on retrouve le même comportement pour les mutants et la protéine native, avec des valeurs de k semblables mais bien plus faibles (Figure 52-A).

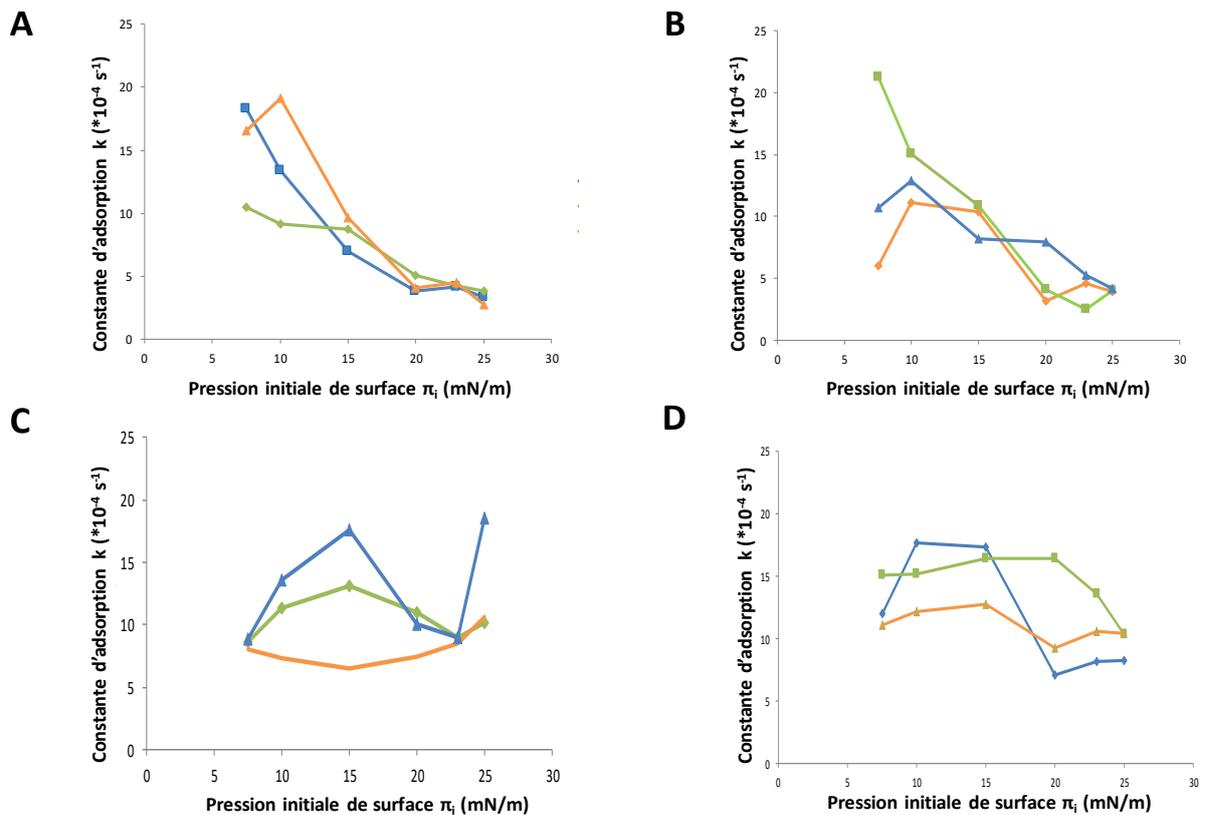


Figure 52 : Valeurs de la constante cinétique d'absorption k (s^{-1}) de la protéine native (en vert), du mutant H155A (en orange) ou du mutant P189A (en bleu) pour les différentes monocouches étudiées. (A) DAG:PG (1:3 mol/mol) ; (B) PG ; (C) DAG ; (D) DAG-PG (3:1 mol/mol).

Avec la monocouche composée uniquement de PG, les mêmes observations qu'avec la monocouche DAG:PG (1:3 mol/mol) peuvent être faites. On remarque cependant que les valeurs de la constante cinétique d'association des deux mutants diminuent (courbes orange et bleue), tandis que les valeurs de la constante d'adsorption de MGD1 native (courbe verte) sont supérieures à celles obtenues précédemment (Figure 52-B). Il y a un effet de la compression sur la vitesse de liaison de la protéine à la membrane.

Les valeurs de la constante cinétique d'association k avec une monocouche composée uniquement de DAG montrent des profils complètement différents de ceux obtenus avec les autres compositions de monocouche (Figure 52-C). Ceci pourrait peut-être être dû au fait que la monocouche de DAG soit en phase fluide. Cependant, les profils de MGD1 et P189A sont assez similaires (courbe verte et bleue). Le profil de H155A (courbe orange) quant à lui est différent avec des valeurs de constantes cinétiques d'adsorption bien moins élevées qui

s'expliquent par le fait que H155 ne peut probablement plus (ou bien moins) interagir avec son substrat (mutant inactif).

Lorsque l'on ajoute du PG à la monocouche de DAG dans les proportions DAG-PG (3:1 mol/mol), on remarque que l'allure des courbes pour MGD1 et P189A (courbe verte et bleue) sont similaires à celles obtenues avec le DAG seul avec des valeurs de la constante cinétique d'association légèrement supérieures. Concernant le mutant H155A, l'allure de la courbe (courbe orange) s'inverse avec de meilleures valeurs de k (Figure 52-D).

La constante cinétique d'adsorption mesurée dans ces différentes conditions permet de mettre en évidence l'impact de la composition lipidique sur les différentes protéines, bien qu'un seul acide aminé soit muté. Les comportements plutôt similaires de MGD1 et P189A (courbe verte et bleue) et le comportement plutôt différent de H155A par rapport à MGD1 (courbe orange et verte), notamment avec l'augmentation de la quantité de DAG dans la monocouche, sont concordants avec les résultats obtenus dans l'article. Ces résultats restent cependant difficiles à interpréter mais confirment que la pression initiale de surface de 15 mN/m est la valeur importante d'étude de cette protéine.

CHAPITRE III : Développement d'un nouveau test d'activité de la MGD1 en monocouche

I. Introduction à l'article

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, le résidu H155 est le résidu catalytique supposé et sa mutation en alanine (H155A) rend l'enzyme totalement inactive. Or MGD1 étant une enzyme interfaciale, la perte d'activité d'un mutant peut être due à deux effets : l'absence de sa liaison à la membrane ou une modification au niveau de son site actif l'empêchant de réaliser l'acte catalytique, bien qu'elle ait conservé ses capacités de liaison (Figure 53).

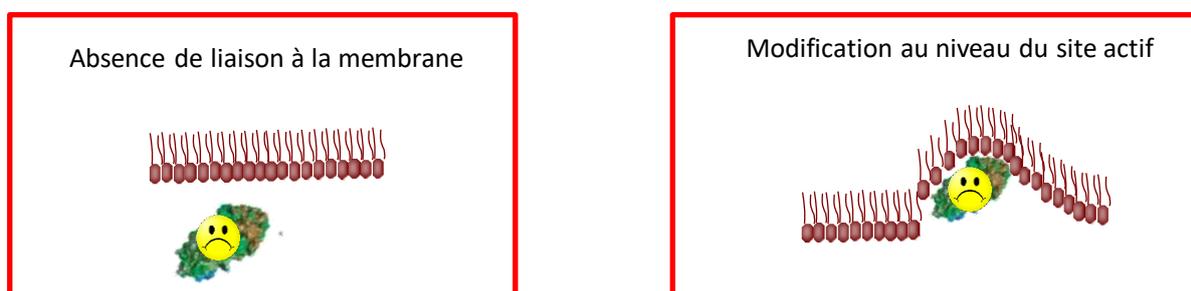


Figure 53 : Les deux effets pouvant entraîner la perte d'activité d'un mutant.

Le dosage radioactif, ou par bioluminescence, actuellement utilisé pour mesurer l'activité de MGD1 ne permet pas de différencier l'étape de liaison à la membrane de celle de l'acte catalytique. En effet, ces dosages utilisent des micelles lipidiques où la liaison de MGD1 à ces dernières et l'acte catalytique transformant le DAG en MGDG sont mesurés de manière globale.

Toujours dans l'optique d'approfondir nos connaissances sur le mode de fonctionnement de MGD1, nous avons recherché un moyen permettant de faire la distinction entre les capacités de liaison à la membrane et l'activité catalytique de MGD1 (Figure 54), afin de pouvoir explorer, sans ambiguïté, les raisons de la perte d'activité d'un mutant. Pour cela, nous avons développé un nouveau test d'activité enzymatique basé sur la technique des monocouches de Langmuir. Ce modèle de membranes a été choisi car il offre la possibilité d'injecter facilement différentes molécules sous la monocouche et d'évaluer les propriétés de

liaison des molécules membranotropes, avant d'enquêter sur l'activité enzymatique. Nous avons ainsi entrepris de suivre la synthèse de MGDG après insertion, dans une première étape, de MGD1 dans la monocouche (« étape de liaison ») et injection, dans une deuxième étape, d'UDP-galactose (le sucre donneur) dans la phase aqueuse (« étape catalytique ») (Figure 54). Une monocouche composée de l'accepteur DAG, et de l'activateur PG, dans un rapport molaire 1:3, a été utilisée pour la mise au point de ce test.

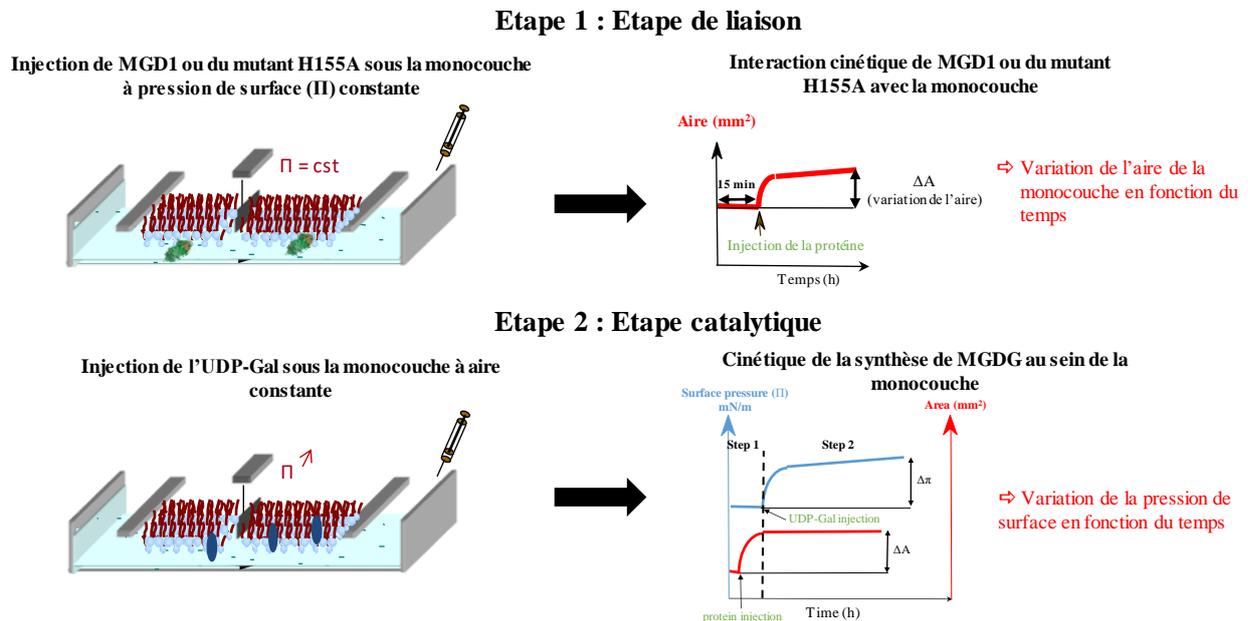


Figure 54 : Principe du test d'activité enzymatique réalisé avec la technique des monocouches de Langmuir. Etape 1 : 'étape de liaison' de la protéine à une monocouche de DAG-PG (1:3 mol/mol) à pression de surface (Π) constante. La variation de l'aire de la monocouche est observée (ΔA). Etape 2 : 'étape catalytique' de la protéine avec injection de l'UDP-Gal sous la monocouche. La variation de pression de surface ($\Delta \Pi$) est observée. A la fin des deux étapes, le MGDG est synthétisé.

Nous avons utilisé la spectrométrie de masse (SM), technique sensible permettant de détecter et d'identifier les molécules d'intérêt, après extraction des lipides selon la méthode de Bligh et Dyer (Bligh & Dyer, 1959).

Le développement de ce test a nécessité plusieurs optimisations concernant le moyen de prélèvement de la monocouche à la fin des expériences. Les premiers prélèvements ont été réalisés sur des petits volumes (500 μ L) par rapport au volume total de la cuve (25 mL). Les quantités de lipides récupérées étant trop faibles, nous avons décidé de procéder au prélèvement intégral de la monocouche, incluant plusieurs rinçages de la cuve au chloroforme, avant de procéder à l'étape de l'extraction lipidique.

L'extraction lipidique a également dû être optimisée car les signaux de SM des lipides dont ceux des lipides de référence interne n'étaient pas visibles, à cause de résidus présents dans le milieu, comme le glycérol qui perturbait l'ionisation. En effet, le glycérol présent dans le tampon utilisé n'était pas éliminé en une seule extraction. C'est pourquoi, nous avons dû effectuer deux extractions constitutives afin que l'eau puisse correctement éliminer le glycérol.

L'analyse des monocouches par SM a permis de mettre en évidence pour la première fois, la synthèse *de novo* de MGDG au niveau des films interfaciaux. L'analyse topographique par AFM de la surface de la monocouche après interaction avec les protéines et transfert sur mica, a permis de corroborer les résultats SM obtenus. Des protubérances, qui peuvent être attribuées à la présence de protéines ou de complexes lipides / glycolipides-protéines, ont été observées uniquement dans les tests réalisés en présence de MGD1 et d'UDP-Gal. Ces structures allongées, bien que plus petites, étaient similaires à celles obtenues précédemment après adsorption de MGD1 sur des monocouches incorporant du MGDG (Sarkis *et al.*, 2014). Avec H155A, aucune structure remarquable n'a été visualisée.

En utilisant ce système, il est clair que le mutant H155A, bien qu'inactif, a conservé sa capacité de liaison à la monocouche DAG-PG (1:3 mol/mol). Ce résultat renforce l'hypothèse du rôle catalytique du résidu H155 (Rocha *et al.*, 2016).

Les résultats de cette partie sont présentés sous forme d'un article prêt à être soumis.

II. Publication

Discrimination between membrane binding capacity and catalytic activity of MGD1, a plant galactolipid synthase, by developing a new enzymatic activity test in Langmuir monolayers

**Milène Nitenberg¹, Juliette Jouhet², Éric Maréchal², Maryse. A. Block²,
Agnès Girard-Egrot^{3*}, Christelle Breton^{1*}**

*co-corresponding authors

¹CERMAV-CNRS, Université Grenoble Alpes, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France.

²Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale ; CNRS, CEA, INRA, Université of Grenoble Alpes, UMR 5168 ; BIG ; 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France.

³ Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université de Lyon, UMR CNRS 5246, Bât. Lederer, 1 rue Victor Grignard, 69622 Villeurbanne cedex, France.

Abbreviations:

MGD1, monogalactosyldiacylglycerol synthase type 1; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; DAG, diacylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PA, phosphaditic acid; UDP, uridine 5'-diphosphate; UDP-Gal, 5'-diphosphate (UDP)- α -D-galactose; UDP-Glc, uridine 5'-diphosphoglucose; IEM, inner envelope membrane; LB, Langmuir-Blodgett; AFM, atomic force microscopy; Π , surface pressure; Π_i , initial surface pressure; Π_e , equilibrium surface pressure; TCEP, tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride; ESI, electrospray ionization source; MS, mass spectrometry

ABSTRACT

Galactolipids are essential to the biogenesis of photosynthetic membranes and to the functioning of photosystems. MGD1 is the major galactolipid synthase in *Arabidopsis thaliana*, responsible for the massive expansion of chloroplastic membranes. MGD1 is a monotopic protein localized in the inner envelope membrane of chloroplasts. It transfers a galactosyl residue from UDP-galactose to diacylglycerol (DAG) to form monogalactosyldiacylglycerol (MGDG). The activity of MGD1 has been so far measured using micelles in assays in which the binding of MGD1 to micelles and the catalysis of MGDG formation are measured globally. Using site-directed mutagenesis, we previously identified a histidine residue (H155) as a putative catalytic residue. However, we addressed the functional role of this residue using point mutated enzymes, either on the capacity to bind to membranes and/or on catalysis itself. A radioactivity-based assay in mixed micelle conditions, classically used to monitor MGD1 activity, did not allow differentiating these two steps: membrane binding and catalytic action. In this context, we developed a new enzymatic activity test using Langmuir monolayers. We monitored MGDG synthesis using a DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer after insertion of a native MGD1 enzyme (*'binding step'*) and injection of UDP-galactose in the aqueous phase (*'catalytic step'*). Mass spectrometry analysis of the biomimetic system demonstrated for the first time the synthesis of MGDG inside interfacial films. Atomic Force Microscopy (AFM) analyses provided structural evidence confirming the *de novo* synthesis of MGDG in the membrane model. By using this system, we demonstrated that H155 mutant substituted with an alanine residue was able to bind DAG-PG monolayer like the native MGD1 whereas it was fully inactive. This result allowed us characterizing the catalytic role of H155. It is the first lipid synthesis ever described in biomimetic membrane

INTRODUCTION

Uncharged galactolipids are the most abundant lipid class on earth. They represent up to 80 % of the lipid constituents of chloroplast membranes [1], the seat of photosynthesis. The two major species are monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG). Other lipids are charged, and mostly consist of the anionic sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and phosphatidylglycerol (PG). MGDG and DGDG are known to stabilize the photosystem protein complexes in chloroplasts [3–7]. They have also a major role in determining the physicochemical properties of chloroplast membranes. MGDG, with its small polar galactosyl headgroup, has a supposed conical shape, which destabilizes the lipid bilayers by forming hexagonal II-type inverted micelles, while the DGDG, of cylindrical form, is favorable to the formation of bilayers [8-9]. Maintaining a constant MGDG/DGDG ratio in thylakoid membranes (at least under standard growth conditions) seems crucial for the stability and the functional integrity of photosynthetic membranes [3], [9].

In *Arabidopsis thaliana*, there are three functional MGDG synthases, called MGD1, MGD2, and MGD3 [10]. They catalyze the transfer of a galactose residue from uridine 5'-diphosphate (UDP)- α -D-galactose (UDP-Gal) to the *sn*-3 position of diacylglycerol (DAG) acceptor to form MGDG. The constitutive enzyme MGD1 provides the bulk of MGDG necessary for the massive expansion of membrane thylakoids, and is considered as a key enzyme in the biogenesis of chloroplast membranes [4], [9]. MGD1 is the only isoform located in the inner envelope membrane (IEM) of chloroplast, whereas the two others are present at the outer envelope [11], [12]. Inhibition of the MGD1 gene in *Arabidopsis* results in the absence of MGDG and DGDG synthesis, a lack of thylakoid membrane formation, and stunting at the embryonic stage [13], [14]. MGD2 and MGD3 are mostly produced in non-photosynthetic tissues and more specifically, they are induced in response to phosphate shortage [10], [15].

MGD1 is a monotopic enzyme which is presumably anchored to the outer leaflet of the IEM [9], [16]–[18]. The membrane binding properties of MGD1 can therefore be considered crucial for the enzyme function since its acceptor is a membrane lipid. We were able to produce the recombinant protein fully active in *Escherichia Coli* [19]. The structure of MGD1, recently solved in its apo form and in complex with UDP, allows getting a more precise idea of its mode of action and its interaction with the membrane [20]. MGD1 adopts the classical GT-B folding in which the C-terminal domain corresponds to the nucleotide-sugar

binding domain while the N-terminal domain is likely involved in the binding of DAG acceptor. One of the peculiarities, highlighted by the resolution of the structure, is the presence of a large disordered loop (not visible in the crystallographic structure) in the N-terminal domain that was proposed to contribute to the anchoring MGD1 in the membrane and to the capture of the DAG acceptor [9], [20]. The current model proposes that MGD1 is inserted into the bilayer essentially by its N-terminal domain *via* this disordered loop.

MGD1 needs anionic lipids such as phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidic acid (PA) to be active [19], [21]. Because PA and PG have a synergic effect on MGD1 activity, they were considered to bind to different sites [21]. Structural and mutagenesis studies highlighted the role of histidine residue H155, as a putative catalytic residue [20], [21]. Indeed, mutation of H155 into alanine resulted in an inactive enzyme [21]. However, as MGD1 is a monotopic enzyme, the loss of activity of H155A mutant could also be attributed to an altered membrane binding capacity. Until now, the activity of MGD1 has so far been measured using mixed micelles in assays in which the binding of MGD1 to micelles and the catalytic conversion of DAG into MGDG are globally measured. The radioactivity-based assay that is currently used to monitor MGD1 activity does not allow differentiating these two steps: membrane binding and catalytic action. In the present study, we developed a new activity test based on the use of Langmuir monolayers. For this purpose, a membrane model formed of a mixture of DAG and PG was used to detect MGDG synthesis at this interface in a two-step procedure, which allows discriminating membrane binding and catalytic steps. We herein present results obtained with the native enzyme and the inactive mutant H155A.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DAG (1-2-dioleoyl-sn-glycerol) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabama, US, COGER, France) and PG (L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol ammonium salt from egg yolk lecithin) from Sigma-Aldrich. UDP-Gal was from Carbosynth (Compton - Berkshire - UK). UDP-Glu (Uridine 5'-diphosphoglucose disodium salt hydrate from *Saccharomyces cerevisiae*) was purchased from Sigma-Aldrich.

Lipid preparation

The solvents were of analytical grade (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The lipid mixtures were prepared at a concentration of 1 mM in chloroform and stored at -20°C under argon to prevent lipid oxidation.

Expression of MGD1 recombinant proteins

We obtained the catalytic domain protein construct of MGD1 as described previously [19]. The sequence was designed starting at E137 and covering the catalytic domain of MGD1 from residues 137 to 533. This sequence fused to a His₆-tag at the C-terminus was expressed in *Escherichia coli* using the pET expression system (Novagen Inc.). This plasmid (designated as pET29b-cdmgd1) was further used to create the H155A mutant, in which the histidine residue was substituted by an alanine residue. MGD1 recombinant protein and the mutant were purified by a two-step procedure, including immobilized metal affinity chromatography and size exclusion chromatography as previously detailed [19]. The pure proteins, in 25 mM Bis-Tris buffer pH 6.5, 150 mM NaCl, 1 mM Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) and 5% (v/v) glycerol, were concentrated to 10 mg/ml and stored at -20°C.

Enzymatic activity test in monolayer

Monolayers were prepared in a homemade Langmuir trough with a symmetric compression system. The rectangular trough has a volume of 25 mL and a surface of 49 cm².

A Wilhelmy plate was used to measure the surface pressure (Π) with an accuracy of ± 0.5 mN/m. The trough was cleaned with ethanol, dichloromethane and ultrapure water successively, and filled with a filtered Bis-Tris buffer [25 mM Bis-Tris propane, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 5% Glycerol; pH 6.5]. All experiments were performed at 20°C. The method of monolayer formation consisted of a drop of 3-4 μL of the lipid solution DAG-PG (1:3 mol/mol) in chloroform at the air/buffer interface with a micro-syringe. After 15 minutes of stabilization and solvent evaporation, the monolayer was compressed at the desired initial surface pressure Π_i of 15 mN/m by two mobile barriers. After stabilization of the monolayer, the protein was injected at a constant surface pressure into the subphase and at a fixed final concentration (4 nM). The injection caused the move back of the barriers leading to an increase of the monolayer area. After stabilization, the monolayer area was kept constant by stopping the mobile barriers and then, the UDP-Gal was injected underneath the monolayer at a final concentration (0.5 mM). This injection triggered the increase of the surface pressure Π until reaching a new equilibrium surface pressure (Π_e), indicating the end of the experiment. After stabilization of the surface pressure, the monolayer was then collected to be analyzed by mass spectrometry to detect the presence of MGDG. The changes in monolayer area induced by the interaction of proteins with the monolayer and the variation in surface pressure after UDP-Gal injection were recorded continuously, as a function of time, with a computer-controlled Langmuir film balance KSV NIMA (Biolin Scientific, Finland). Each experiment was repeated at least three times for each set of conditions.

Lipid extraction

The Bligh and Dyer method [22] was used to extract total lipids from aqueous samples. Lipid extraction was performed in glass flasks allowing decantation. Each sample was completed with water to a final volume of 22.5 mL. 25 mL of chloroform and 25 mL of methanol were successively added to the flasks. The whole content was mixed under argon and the two phases let to settle until clearing. The lower chloroform phase, containing lipids, was recovered and dried under argon. The tube containing dried lipids was resuspended with 25 ml chloroform, 22.5 ml water and 25 ml methanol, and the whole was transferred in the separating funnel for a second extraction. The same extraction protocol was carried out and after dry evaporation under argon, lipids were stored at -20 °C before use.

LC-MS/MS

The analytical method used was LC-MS/MS. Firstly, it consisted in separating the molecules using high performance liquid chromatography (HPLC). These molecules were ionized by an electrospray ionization source (ESI) with very little ionization degree. These ions were consecutively injected into the MS/MS in tandem where they were isolated and then, fragmented by collision with an inert gas. The resulting masses of the fragment ions were determined. The quantification of molecules depended on many parameters, making it difficult. So, the use of internal standard was required. The ideal internal standard must have the same structure as the molecule to be analyzed but it must be marked with carbon 13 in order to be differentiated. Standards were added to the sample for the assay. However, no internal standard specific to each molecule existed, so in our case, it corresponded to a class of lipids [23]. This method allowed us to visualize only what we were looking for in our sample. DAG and MGDG were dosed against a DAG standard. The level of PG recovered was evaluated against a standard of SQDG.

Atomic force microscopy (AFM)

A KSV 2000 Langmuir-Blodgett trough (three multi-compartment system, KSV NIMA Biolin scientific, Finland) with a symmetrical compression system was used to measure the surface pressure and prepare AFM samples by using Langmuir-Blodgett (LB) transfer. After the stabilization of the surface pressure at the end of the activity test, the Langmuir film was transferred onto freshly cleaved mica plates at constant surface pressure by vertically raising (1mm/min) the mica through the lipid/liquid interface. AFM images of LB films was performed in tapping mode using a Solver PRO atomic force microscope (NT-MDT) under ambient conditions with a scanning area of $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Topographic images were acquired using silicon nitride tips on integral cantilevers with a nominal spring constant of 1.45-15.1 N/m and a frequency between 87-230 kHz. Representative images were obtained from ≥ 2 samples prepared on different days and from ≥ 3 macroscopically separated areas on each sample.

RESULTS and DISCUSSION

In order to differentiate between the catalytic action of MGD1, an interfacial membrane enzyme, and its membrane binding capacities, a novel method has been developed, based on the Langmuir monolayers as membrane models. We previously used this membrane model consisting of a lipid monolayer at the air/water interface for its suitability to evaluate the membrane binding properties of monotopic molecules and the possibility of injecting different ligands underneath the monolayer [24]–[26]. This experimental design had never been used to date for an activity producing novel lipid classes, but rather for lipid hydrolyses.

Previous studies enabled us to identify the experimental conditions for the setting up of the assay. The study of different lipid compositions and lipid packing showed that a monolayer formed of a DAG-PG mixture (used at the molar ratio 1:3 mol/mol), thus comprising only the DAG acceptor and the PG activator, was the most appropriate to investigate the membrane binding properties of MGD1 [24]. Also, an initial surface pressure of 15 mN/m appeared to be the most favorable molecular environment for a prompt MGD1 binding to the membrane, according to the value of the binding rate (k) determined from the adsorption kinetics [24].

The trough was filled with a buffer composed of 25 mM Bis-tris pH 6.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 1mM TCEP. The protein was used at 4 nM. This concentration was experimentally determined as optimal for protein insertion into the lipid monolayer at a constant surface pressure. The final concentration of the UDP-Gal, sugar donor was set at 0.5 mM, a value well above the K_M value (80 μ M) of MGD1 for UDP-Gal.

1. Activity test: MGDG synthesis in monolayers

The first step of the activity test developed in this study corresponds to the '*binding step*' of the protein to a DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer maintained at a constant surface pressure (Π) of 15 mN/m. The protein insertion could be followed by the increase of the monolayer area as a function of time (barriers were not stopped). The second step corresponds to the '*catalytic step*'. The sugar donor (UDP-Gal) was then injected underneath the monolayer adsorbing the protein at a constant area (barriers were stopped), to allow the

synthesis of MGDG. This step can be followed by measuring the increase of initial surface pressure (Π_i) as a function of time.

1.1 Control experiments

Several control experiments were performed to check the stability of the system over time. At first, a DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer was compressed and maintained at an initial surface pressure of 15 mN/m. A similar volume of buffer was then injected into the subphase to simulate the enzyme and UDP-Gal injections (Fig. 1A). In the first part (simulation of the protein injection of the '*binding step*'), the monolayer area was stable over time (Fig 1A, red curve). In the second part (simulation of the UDP-Gal injection of the '*catalytic step*'), there was a slight increase of the surface pressure (Fig 1A, blue curve) as a function of time, until a new equilibrium value Π_e was reached (plateau). This slight increase ($\Delta\Pi=2.2$ mN/m) was probably due to the relaxation of the monolayer over time (the experiment was carried out over several hours). The second experiment control addressed the stability of the DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer after injection of the UDP-Gal only. A similar shape of the curve of the surface pressure (Π) as a function of time was observed (Fig 1, blue curve). It corresponded to the slight modification of the molecular packing under UDP-Gal injection. The last control addressed the stability of the DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer after injection of the MGD1 only. In this case, an important increase of the monolayer area was observed when the surface pressure was maintained constant at 15 mN/m, reflecting the insertion of MGD1 into the monolayer (Fig 1B, red curve, '*Binding step*'). For the second step (simulation of the UDP-Gal injection of the '*catalytic step*'), a similar moderate increase of the surface pressure (Π) was observed over time (Fig. 1B, blue curve). After lipid extraction and mass spectrometry analyses, no trace of MGDG was detected for these different control experiments (Table 1). Altogether, these results indicate that the surface pressure variation ($\Delta\Pi$) of 2.4 mN/m observed in Fig. 1B (blue curve) is due to the adsorption of the protein that continued even after stopping the barriers and maintaining constant the monolayer area. This value of 2.4 mN/m was used as the threshold beyond which any surface pressure variation could be considered as significant and independent of MGD1 adsorption.

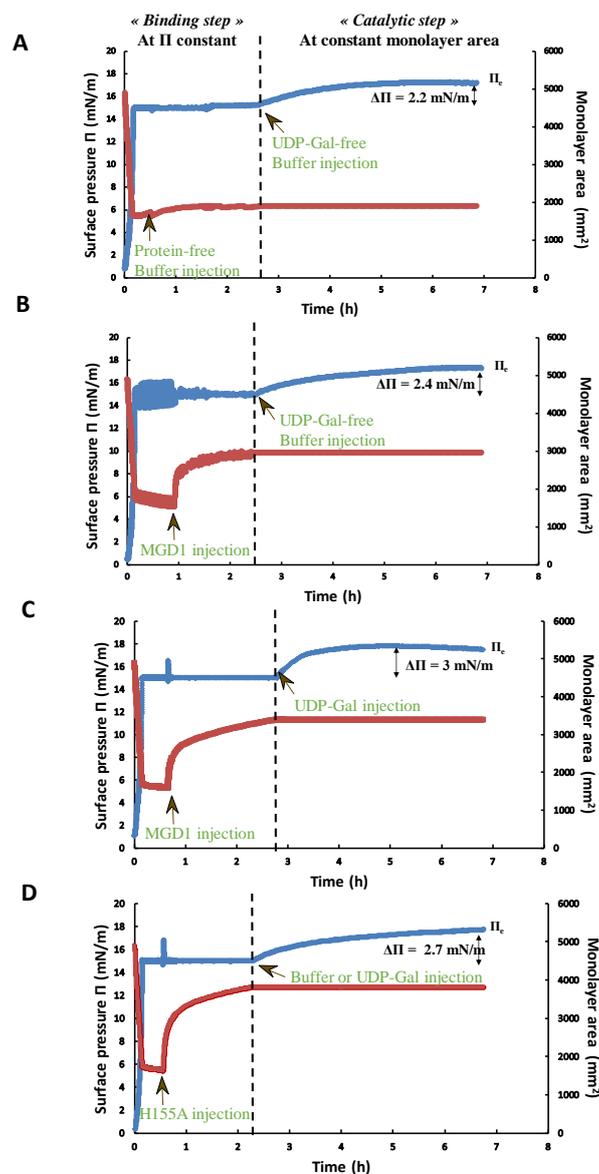


Fig 1: (A) Monitoring the stability of the DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer over time after injection of protein-free or UDP-Gal-free buffer as negative control condition. Red curve: monolayer area variation after injection of buffer as negative control for the injection of the protein at a constant pressure (Π) of 15 mN/m. Blue curve: surface pressure variation after injection of buffer as negative control for the injection of UDP-Gal at constant monolayer area. The first part of the curves corresponded to the monitoring at constant surface pressure (Π) (step 1) and the second part, corresponded to the monitoring at constant monolayer area. **(B) Interaction of MGD1 with DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer at initial surface pressure (Π) of 15 mN/m.** Red curve: monitoring the variation of the monolayer area over time after injection of MGD1 at constant pressure (Π) of 15 mN/m ('Binding step'). Blue curve: monitoring the surface pressure variation as a function of time after injection of buffer as negative control for UDP-Gal at constant monolayer area (simulation of the 'catalytic step').

(C) Interaction of MGD1 with DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer at a constant initial surface pressure (Π) of 15 mN/m ('Binding step') and injection of the UDP-Gal at constant monolayer area ('catalytic step'). Red curve: monitoring the monolayer area over time after injection of MGD1 at constant surface pressure (Π) of 15 mN/m. Blue curve: monitoring the surface pressure over time after injection of UDP-Gal at constant area. **(D) Interaction of H155A with DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer at a constant initial surface pressure (Π) of 15 mN/m ('Binding step') and injection of buffer or the UDP-Gal at constant monolayer area ('catalytic step').** Red curve: monitoring the monolayer area over time after injection of H155A at constant surface pressure (Π) of 15 mN/m. Blue curve: monitoring the surface pressure over time after injection of UDP-Gal at constant area.

1.2 MGD1 activity test in diacylglycerol/phosphatidylglycerol monolayers

The multiphasic reaction system was then developed by injection of MGD1 underneath a DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer maintained at a constant initial surface pressure (Π) of 15 mN/m ('Binding step'), followed by the injection of UDP-Gal underneath the monolayer adsorbing MGD1 and maintained at a constant monolayer area ('Catalytic step'). During the 'binding step' an increase of the monolayer area (Fig. 1C, red curve), similar to that obtained for the control experiment with injection of MGD1 only (Fig 1B, red curve), was observed, reflecting the insertion of the protein into the DAG-PG monolayer. For the 'catalytic step', the final surface pressure variation ($\Delta\Pi\sim 3$ mN/m) over time (Fig. 1C, blue curve) was higher than the control experiment (Fig. 1B, blue curve), with a 'kink' of the slope which had never been observed in any negative control condition. After lipid extraction, mass spectrometry analyses highlighted the presence of MGDG in the monolayer (Table 1). These results indicate that the beginning of the slope (before the 'kink') (Fig.1C, blue curve) probably corresponds to the synthesis of MGDG over time in addition to the continuous and moderate adsorption of MGD1 measured in negative control conditions (Fig. 1B, blue curve). This *de novo* and *in situ* synthesis of MGDG was responsible for the higher surface pressure variation recorded during the 'catalytic step'. To avoid any doubt on the synthesis of MGDG after injection of UDP-Gal by MGD1 inserted within the monolayer, we performed the same experiment by replacing injection of UDP-Gal by UDP-Glc. UDP-Glc is not a sugar donor for MGD1 (personal data). With UDP-Glc, no MGDG was detected into the monolayer after extraction and MS analysis (Table 1). Altogether, these results indicated the first ever *de novo*

synthesis of galactolipids in a biomimetic monolayer system (Fig1C), allowing us to discriminate between the membrane binding capacities of the protein and the catalytic action. This new enzymatic activity test gave the opportunity to discriminate between a loss of membrane binding capacity and/or of catalytic function.

1.3 H155A activity test in diacylglycerol / phosphatidylglycerol monolayers

The histidine 155 residue was previously proposed as the catalytic base for the galactosyl transfer reaction onto DAG [20]. The mutation of this residue into alanine yielded an inactive enzyme, when tested in mixed micelle assays [20], [21]. We also showed that the H155A mutant conserved a similar membrane binding capacity as MGD1 on a DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer (see chapter II of the thesis manuscript). Altogether, these results reinforce the hypothesis that H155 is a catalytic residue and that the loss of enzymatic activity of H155A could be due to the loss of its catalytic function, not to its membrane binding properties. It was therefore interesting to test the behavior of H155A mutant in our activity test.

Therefore, a similar experiment was performed replacing native MGD1 by the mutant H155A. As shown in Fig. 1D, we observed the same profile as for native MGD1 in the “*Binding step*”, thus confirming the adsorption of the mutant to the DAG-PG monolayer. However, the injection of UDP-Gal or buffer alone yielded the same profiles as for the negative controls of MGD1 during the “*catalytic step*”, with a surface pressure variation $\Delta\Pi=2.7$ mN/m, over time. No MGDG could be detected by MS analysis (Table 1). These results confirmed that the H155A mutant did not lose its membrane binding capacity and that H155 is definitely an essential catalytic residue of MGD1.

Experimental conditions	MGDG
DAG-PG / MGD1 / UDP-Galactose	+
DAG-PG / MGD1 / UDP-Glucose	-
DAG-PG / H155A	-
DAG-PG / H155A / UDP-Galactose	-
DAG-PG monolayer	-
DAG-PG / MGD1	-
DAG-PG / UDP-Galactose	-

Table 1: Detection of the presence of MGDG formed in the DAG-PG monolayer under various experimental conditions. Monolayers were collected and subjected to mass spectroscopy analyses.

Hence, this new enzymatic test allowing discrimination between the binding of the protein to the membrane and the catalytic act of the enzyme appears as an attractive approach to thoroughly dissect the behaviour of interfacial enzymes which have membrane lipids as substrates. It allows checking that a membrane protein cannot be active because it does not bind to the membrane, or, on the contrary, that it is able to bind to the membrane, but it is inactive because of a dysfunction of its active site.

2. Morphology of the biomimetic system after MGDG synthesis

In a previous study, we showed that MGD1 self-organized in the presence of its product MGDG, in form of elongated and reticulated proteic or lipoproteic structures, that could contribute to the scaffolding of embryonic prothylakoids at the surface of the IEM, thus preparing the protrusion of flattened sacks and the dazzling biogenesis of photosynthetic membranes [24].

In order to evaluate the impact of the MGDG synthesis on the morphology of the monolayer during the enzyme activity test, AFM was used to image the putative lipoproteic organization at the mesoscopic scale. For this purpose, the monolayer was transferred at

constant surface pressure by vertical dipping on freshly cleaved mica at the end of the activity test.

2.1. Morphology after MGD1 or H155A injection (*Binding step*)

The morphology of the monolayer before injection of MGD1 was checked in control conditions. As shown in Fig 2A, a homogeneous monolayer on mica, with no visible phase separation, was observed for DAG-PG (1:3 mol/mol) monolayer.

After injection of MGD1 (*'Binding step'*), AFM images revealed the presence of small patches (Fig 2B), which could be attributed to the presence of proteins or lipid / protein complexes, embedded in a darker matrix corresponding to a lipid monolayer, as previously shown by Sarkis *et al.* 2014 [24] after adsorption of MGD1 onto a pure DAG or DAG-PG monolayers. AFM images of the monolayer transferred after interaction of H155A, also revealed the presence of the small patches (Fig 2C), confirming that the binding properties of the mutant protein was not modified.

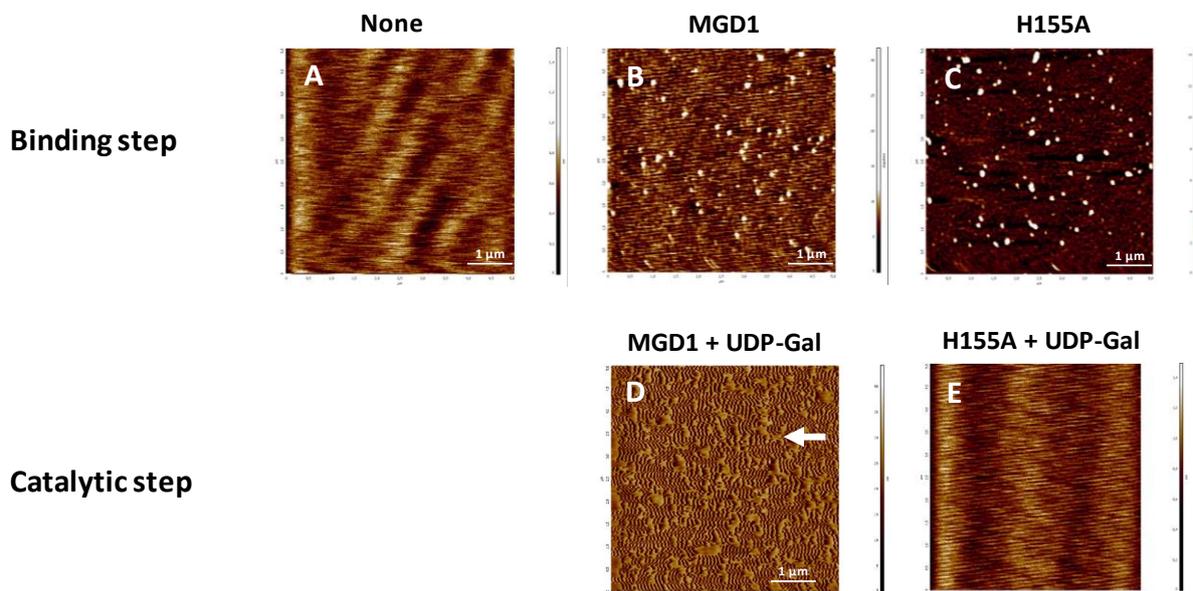


Figure 2: AFM topographic images of transferred protein/lipids film, after the adsorption of the proteins, MGD1 or H155A, onto the DAG-PG (1:3 mol/mol) (*Binding step*) lipid monolayer and injection or not of UDP-Gal (*Catalytic step*).

(A) without protein, (B) MGD1, (C) H155A, (D) MGD1 + UDP-Gal, (E) H155A + UDP-Gal. White arrow in D indicates the presence of elongated structures. In all images, scan size is $5 \times 5 \mu\text{m}^2$.

2.2. Morphologies after MGD1 or H155 binding and UDP-Gal injection (*Catalytic step*)

The morphologies of the monolayers at the end of the catalytic step, after MGD1 and UDP-Gal injections revealed structural differences (Fig. 2D). After *in situ* synthesis of MGDG into the monolayer, protrusions, which can be attributed to the presence of proteins or lipid/glycolipid-protein complexes, were observed. These elongated structures, although smaller, are reminiscent to those obtained previously after adsorption of MGD1 on a pure MGDG monolayer [24]. With H155A, no such remarkable structure was visible (Fig 2E). The presence of UDP-Gal seemed change first interactions between H155A and the monolayer, leading to a homogeneous film. Altogether, these results confirmed i) the presence of MGDG *de novo* synthesized inside the monolayers after the binding of MGD1 and the injection of UDP-Gal during the '*catalytic step*' and ii), the loss of enzyme activity of H155A mutant due to the disappearance of the catalytic residue in the active site of the enzyme.

CONCLUSION

In order to better characterize the behaviour of an interfacial membrane-bound enzyme, MGD1, we used a biomimetic system based on Langmuir monolayers as membrane models, allowing the discrimination between the binding phase of the enzyme and the catalytic transformation of its substrate, the DAG, into its product, the MGDG. The achievement of this new enzymatic activity test allowed us to perform the first ever *de novo* synthesis of a lipid class within monolayers. We believe that this strategy could be generalized to scrutinize the binding and enzymatic behaviour of other interfacial membrane-bound enzymes as previously demonstrated for lipases [27].

REFERENCES

- [1] M. A. Block, A.-J. Dorne, J. Joyard, and R. Douce, "Preparation and Characterization of Membrane Fractions Enriched in Outer and Inner Envelope Membranes from Spinach Chloroplasts," *J. Biol. Chem.*, vol. 258, pp. 13281–13286, 1983.
- [2] K. Kobayashi, "Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development," *J. Plant Res.*, vol. 129, pp. 565–580, 2016.
- [3] P. Dörmann and C. Benning, "Galactolipids rule in seed plants," *Trends Plant Sci.*, vol. 7, pp. 112–118, 2002.
- [4] L. Boudière *et al.*, "Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1837, pp. 470–480, 2014.
- [5] M. R. Jones, "Lipids in photosynthetic reaction centres: Structural roles and functional holes," *Prog. Lipid Res.*, vol. 46, pp. 56–87, 2007.
- [6] N. Mizusawa and H. Wada, "The role of lipids in photosystem II," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1817, pp. 194–208, 2012.
- [7] K. Gounaris, J. Barber, and J. L. Harwood, "The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts.," *Biochem. J.*, vol. 237, pp. 313–326, 1986.
- [8] K. Gounaris and J. Barber, "Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in Nature," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 8, pp. 378–381, 1983.
- [9] J. Rocha *et al.*, "Do Galactolipid Synthases Play a Key Role in the Biogenesis of Chloroplast Membranes of Higher Plants?," *Front. Plant Sci.*, vol. 9, pp. 1–7, 2018.
- [10] K. Awai *et al.*, "Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, pp. 10960–10965, 2001.
- [11] H. Härtel, P. Dormann, and C. Benning, "DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, pp. 10649–10654, 2000.
- [12] M. X. Andersson, K. E. Larsson, H. Tjellström, C. Liljenberg, and A. S. Sandelius, "Phosphate-limited oat: The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 27578–27586, 2005.
- [13] P. Jarvis, P. Dormann, C. A. Peto, J. Lutes, C. Benning, and J. Chory, "Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1

- mutant," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, pp. 8175–8179, 2000.
- [14] K. Kobayashi, M. Kondo, H. Fukuda, M. Nishimura, and H. Ohta, "Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, pp. 17216–17221, 2007.
- [15] K. Kobayashi, K. Awai, M. Nakamura, A. Nagatani, T. Masuda, and H. Ohta, "Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation," *Plant J.*, vol. 57, pp. 322–331, 2009.
- [16] C. Miège *et al.*, "Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG," *Eur. J. Biochem.*, vol. 265, pp. 990–1001, 1999.
- [17] C. Xu, "Mutation of the TGD1 Chloroplast Envelope Protein Affects Phosphatidate Metabolism in Arabidopsis," *Plant Cell Online*, vol. 17, pp. 3094–3110, 2005.
- [18] L. Vojta, J. Soll, and B. Bölder, "Protein transport in chloroplasts - Targeting to the intermembrane space," *FEBS J.*, vol. 274, pp. 5043–5054, 2007.
- [19] J. Rocha *et al.*, "Revisiting the expression and purification of MGD1, the major galactolipid synthase in Arabidopsis to establish a novel standard for biochemical and structural studies," *Biochimie*, vol. 95, pp. 700–708, 2013.
- [20] J. Rocha *et al.*, "Structural insights and membrane binding properties of MGD1, the major galactolipid synthase in plants," *Plant J.*, vol. 85, pp. 622–633, 2016.
- [21] E. Dubots *et al.*, "Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 6003–6011, 2010.
- [22] E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, pp. 911–917, 1959.
- [23] J. Jouhet *et al.*, "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*, vol. 12, pp. 1–21, 2017.
- [24] J. Sarkis *et al.*, "The influence of lipids on MGD1 membrane binding highlights novel mechanisms for galactolipid biosynthesis regulation in chloroplasts," *FASEB J.*, vol. 28, pp. 3114–3123, 2014.
- [25] M. Nitenberg *et al.*, "The potent effect of mycolactone on lipid membranes," *PLoS*

- Pathog.*, vol. 14, no. 1, 2018.
- [26] S. Rebaud *et al.*, "Specific interaction to PIP2 increases the kinetic rate of membrane binding of VILIPs, a subfamily of Neuronal Calcium Sensors (NCS) proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1838, no. 10, pp. 2698–2707, 2014.
- [27] J. F. Cavalier, S. Ransac, R. Verger, and G. Buono, "Inhibition of human gastric and pancreatic lipases by chiral alkylphosphonates. A kinetic study with 1,2-didecanoyl-sn-glycerol monolayer," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 100, pp. 3–31, 1999.

III. Problèmes rencontrés pour la quantification des lipides par SM

La réaction catalytique de MGD1 est basée sur le transfert du résidu galactosyl de l'UDP-Galactose sur le DAG afin de former le MGDG. Le PG joue un rôle d'activateur de MGD1. Ainsi, les résultats de quantification des lipides attendus après synthèse de MGDG dans la monocouche, sont que la quantité de DAG est censée diminuer et la quantité de PG est censée rester stable. Cependant, les résultats obtenus en SM montrent que la quantité de PG récupérée (initialement connue dans la monocouche) est parfois très faible. Normalement, la détection du PG est sensible et fiable. Malgré la récupération intégrale de la monocouche, une perte très importante (quasiment la totalité) du PG a toujours été observée. Plusieurs hypothèses ont pu être avancées : i) le PG pourrait être perdu lors des expériences en monocouches, mais le PG étant un lipide insoluble en milieu aqueux, cette hypothèse paraît peu plausible ; ii) la perte de PG serait due aux nombreuses étapes d'extractions requises, mais elle serait alors associée à une perte similaire des autres lipides. Par contre, le point très positif de la technique SM a été de détecter sans ambiguïté la formation de MGDG.

Des problèmes ont également été rencontrés pour la quantification du DAG. La présence de signaux interférant avec celui du DAG étaient présents sur les spectrogrammes, rendant la quantification imprécise. La quantité de MGDG étant évaluée par rapport au standard de DAG, la difficulté de voir le DAG sur ces échantillons a rendu difficile la quantification du MGDG. En conclusion, dans le cadre de cette étude, seule une analyse qualitative de la présence de MGDG synthétisé en monocouches a pu être réalisée.

CHAPITRE IV : Résultats préliminaires de l'étude de MGD1 de *Caldilinea aerophila* (CaMGD1)

I. Expression et purification de CaMGD1

L'équipe de Koichiro Awai de l'Université de Shizuoka au Japon, nous a fait parvenir la séquence d'une MGD1 exprimée par la bactérie *Caldilinea aerophila* (CaMGD1) composée de 380 acides aminés. Les séquences de la CaMGD1 et de MGD1 d'*Arabidopsis thaliana* possèdent 54 % d'identité, avec conservation des résidus importants impliqués dans le mécanisme catalytique de MGD1. La bactérie *Caldilinea aerophila* est une espèce de bactérie thermophile dont les caractéristiques phylogénétiques, génotypiques et phénotypiques considèrent qu'elle représente un nouveau genre (Sekiguchi *et al.*, 2003). La CaMGD1 est à la fois une glucosyltransférase et une galactosyltransférase. Il est extrêmement intéressant d'exprimer, de purifier et de cristalliser cette protéine, afin d'obtenir des informations qui pourraient nous aider à résoudre la partie manquante de MGD1 et qui permettraient également de mieux comprendre son mécanisme de fonctionnement et sa double spécificité Gal/Glc transférase. La séquence codante pour la CaMGD1 a été clonée dans le plasmide pET24a, possédant un gène de résistance à la kanamycine et le promoteur T7. Cette protéine est exprimée avec une étiquette histidine en position C-terminale dans la souche d'expression BL21. Pour l'expression et la purification de cette protéine bactérienne, les mêmes protocoles que ceux de MGD1 ont été suivis (partie Matériels et Méthodes I2) et II2). La Figure 55 montre que la protéine est produite majoritairement sous forme de corps d'inclusion (CI). Les essais de purification à partir d'un culot de protéine ont permis d'obtenir une fraction soluble pure de CaMGD1 (Figure 56) et une quantité de 0,025 mg de protéine.

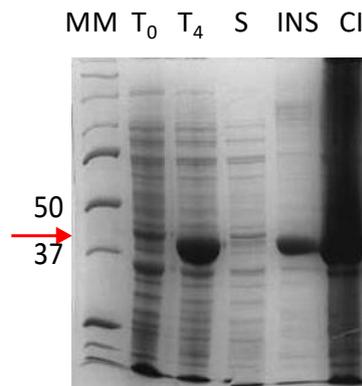


Figure 55 : Analyse par SDS-PAGE de la production de CaMGD1 avant (T_0) et après induction pendant 4 heures (T_4) à l'IPTG (0,25 mM) à 30°C. MM : marqueurs moléculaires en kDa, S : fraction soluble déposée, INS : fraction insoluble, CI : corps d'inclusion. Révélation au bleu de Coomassie. La flèche rouge indique le poids moléculaire correspondant à notre protéine, soit 44 kDa.

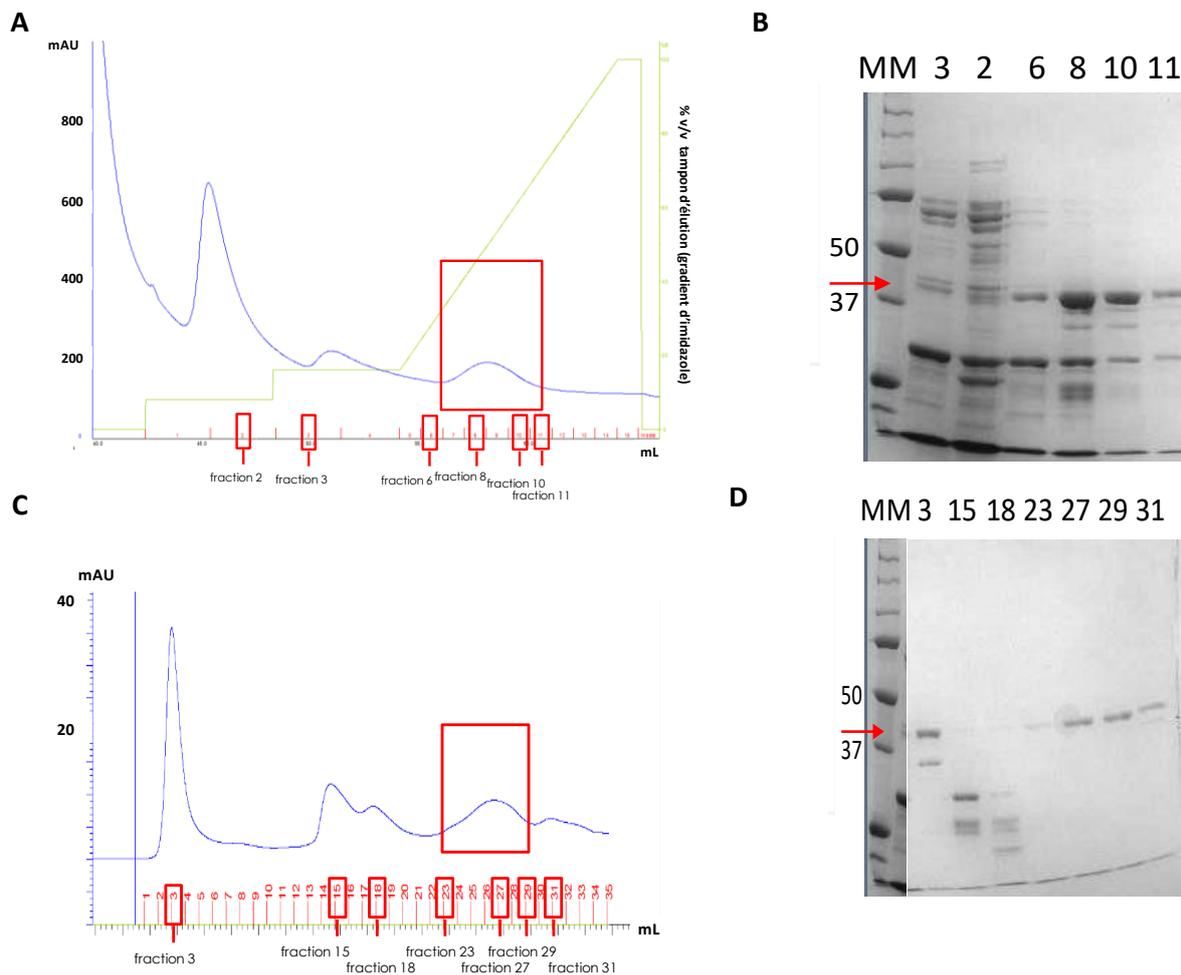


Figure 56 : Purification de la CaMGD1. (A) Purification par chromatographie d'affinité sur HisTrap. La ligne verte représente le gradient d'imidazole appliqué. Le cadre rouge correspond aux fractions contenant la protéine d'intérêt. (B) Analyse par SDS-PAGE de l'étape de purification HisTrap. MM : marqueur en kDa ; 2, 3, 6, 8, 10, 11 : fractions d'élution. Révélation au bleu de Coomassie. La flèche rouge indique le poids moléculaire correspondant à la protéine.

(C) Purification par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Le cadre rouge correspond aux fractions contenant la protéine d'intérêt. (D) Analyse par SDS-PAGE de l'étape de purification SEC. MM : marqueur en kDa ; 3, 15, 18, 23, 27, 29, 31 fractions d'élution. Révélation au bleu de Coomassie. La flèche rouge indique le poids moléculaire correspondant à la protéine.

II. Tests d'activité en radioactivité de CaMGD1 avec effecteurs

La quantité de CaMGD1 obtenue après purification est suffisante pour réaliser des tests d'activité et effectuer une comparaison avec ceux réalisés avec MGD1. La Figure 57 montre les résultats obtenus pour les tests d'activité réalisés avec CaMGD1 en présence d'AP, ou de PG ou sans lipide anionique, en comparaison avec la MGD1 d'*Arabidopsis thaliana*.

Le profil des activités de ces deux enzymes est assez similaire : l'activité spécifique est plus importante en présence d'AP que de PG, et la perte de l'activité en absence de lipide anionique pour les deux enzymes. Ces résultats montrent que CaMGD1 semble avoir un comportement similaire à MGD1.

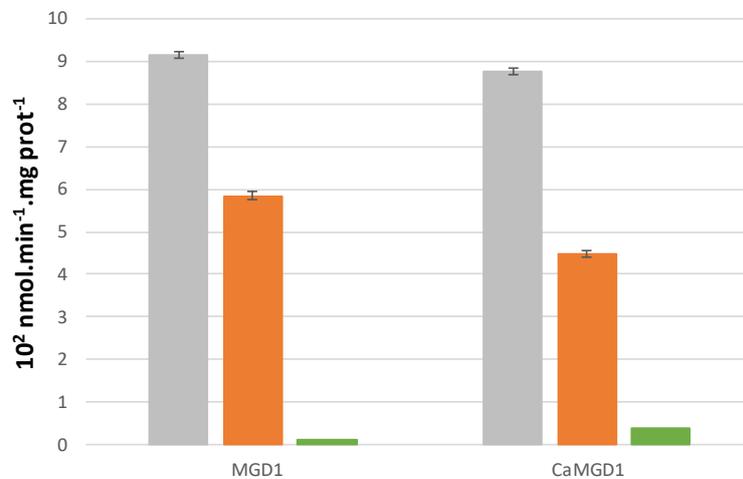


Figure 57 : Résultats obtenus par radioactivité montrant l'influence de l'acide phosphatidique (AP en gris) ou du phosphatidylglycérol (PG en orange) ou sans lipides anioniques (en vert) sur l'activité de MGD1 et de la CaMGD1

Ces résultats restent préliminaires. En effet, la difficulté de la production en grande quantité de cette protéine et le manque de temps pour l'optimisation de l'expression et de la purification ont conduit à seulement étudier l'activité de la protéine. Une quantité de protéine plus importante est requise pour permettre des études de cristallographie. Il serait utile d'optimiser la production de CaMGD1 en jouant notamment sur les conditions d'expression (température d'induction : 16°C au lieu de 30°C, durée, concentration en IPTG). Les premiers essais réalisés n'ont pas permis d'améliorer cette étape de production. On peut aussi envisager d'autres systèmes d'expression faisant appel à des protéines de fusion par exemple pour améliorer la production de CaMGD1 sous forme soluble.

CONCLUSION GENERALE

Les galactolipides non chargés tels que le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) sont les constituants majeurs des membranes des chloroplastes et peuvent représenter jusqu'à 80% des lipides totaux de la membrane interne de l'enveloppe et des membranes thylakoïdiennes (Block *et al.*, 1983). Les autres lipides, moins abondants, sont des glycérolipides anioniques comprenant le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et le phosphatidylglycérol (PG). Les galactolipides ont des fonctions essentielles dans la cellule végétale par leur implication dans la biogenèse des chloroplastes, ainsi que dans le fonctionnement des photosystèmes. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe trois MGDG synthases fonctionnelles : MGD1, MGD2, MGD3 qui permettent d'initier la synthèse des galactolipides (Jarvis *et al.*, 2000). Mon sujet de thèse a porté sur l'étude structurale et fonctionnelle de la MGDG synthase 1 (MGD1) d'*Arabidopsis thaliana* qui est l'isoforme principale, la plus abondante et la plus active. En effet, des études réalisées sur des plantes mutées au niveau du gène *mgd1* ont montré que, dans des conditions de croissance normales, cette isoforme était responsable de la biosynthèse de l'essentiel des galactolipides dans les tissus photosynthétiques (Jarvis *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007). MGD1 est une protéine membranaire monotopique ancrée dans la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes (Maréchal *et al.*, 1995; Miège *et al.*, 1999). La question de sa localisation précise, à savoir si elle est exposée du côté de l'espace inter-membranaire ou du côté du stroma, voire des deux côtés, est encore aujourd'hui débattue (Rocha *et al.*, 2018). MGD1 catalyse le transfert d'un résidu galactose à partir de l'UDP-Galactose (UDP-Gal) sur le diacylglycérol (DAG) pour former le MGDG. Une partie du MGDG produit sera transformée en DGDG grâce à l'action d'une DGDG synthase localisée dans la membrane externe de l'enveloppe. Les mécanismes de transfert de ces galactolipides entre les deux membranes de l'enveloppe et vers les membranes des thylakoïdes restent encore largement méconnus.

La structure de MGD1, récemment résolue au laboratoire ainsi que des études biochimiques ont permis de se faire une idée plus précise de son mode d'action et de son interaction avec la membrane. C'est une protéine formée de deux domaines globulaires de taille similaire dont le site actif est situé à l'interface de ces deux domaines (Rocha *et al.*, 2016). Le modèle actuel propose que MGD1 soit insérée dans la membrane principalement par son domaine N-terminal *via* une grande boucle qui s'est avérée essentielle pour la capture de l'accepteur DAG (Rocha *et al.*, 2016). Un mécanisme réactionnel de type S_N2 a été proposé pour MGD1 dans lequel le résidu histidine 155 jouerait le rôle de base catalytique. La mutation de ce résidu en alanine abolit totalement l'activité de l'enzyme (Dubots *et al.*, 2010). D'autres

études ont révélé que MGD1 avait besoin de lipides anioniques tels que l'AP et le PG pour être active, mais le mode d'activation est à ce jour inconnu (Dubots *et al.*, 2010). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier deux résidus (P189 et W287) potentiellement impliqués dans la liaison au PG.

Mon sujet de thèse a eu pour objectif de mieux appréhender le processus de biosynthèse des galactolipides en essayant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de régulation de l'activité de MGD1 par le PG. Nous nous sommes intéressés à la protéine MGD1 native ou mutée au niveau de ces trois résidus essentiels à son activité. Ces protéines ont été exprimées sous forme recombinante chez *Escherichia coli* et purifiées jusqu'à homogénéité, en utilisant un protocole préalablement établi au laboratoire (Rocha *et al.*, 2013).

Nous avons obtenu des rendements et une qualité d'échantillon identiques à la protéine native pour les mutants H155A et P189A. En revanche, le mutant W287A s'est révélé difficile à produire et s'est montré très instable durant la purification, empêchant ainsi toute étude ultérieure.

Des essais antérieurs de cristallisation avaient permis d'obtenir la structure de la MGD1 dans sa forme apoenzyme et en complexe avec l'UDP (Rocha *et al.*, 2016). J'ai poursuivi ce travail en testant de nouvelles conditions permettant d'obtenir de nouveaux complexes, notamment avec l'UDP-Gal intact et avec l'accepteur DAG et/ou le PG, en utilisant soit la MGD1 native, soit le mutant inactif H155A. Certaines de ces conditions ont permis d'obtenir des cristaux, mais de taille trop petite pour obtenir un cliché de diffraction exploitable. Ces efforts devront être poursuivis car il est important d'obtenir de nouvelles structures de complexes pour mieux appréhender le mécanisme réactionnel de l'enzyme.

L'activité MGDG synthase avait jusqu'à présent été mesurée par un test radioactif permettant le suivi du transfert du galactose marqué au carbone 14 à partir de l'UDP-¹⁴C-gal sur le DAG, en présence d'AP ou de PG. Cette technique est lourde car elle nécessite de purifier le MGDG pour quantifier l'activité de l'enzyme. Au cours de mes travaux de thèse, j'ai eu l'occasion de mettre au point une nouvelle méthode de dosage de l'activité MGDG synthase permettant d'une part de s'affranchir de l'utilisation de substrats radioactifs et d'autre part, un gain de temps avec une meilleure sensibilité. Cette méthode, basée sur la technique de l'UDP-Glo™, kit commercial vendu par Promega, utilise le principe de la bioluminescence et consiste à mesurer l'UDP libéré au cours de la réaction enzymatique. Nos résultats montrent que cette technique est tout à fait adaptée à la mesure de l'activité d'enzymes fonctionnant

dans des systèmes micellaires. En effet, les résultats des tests d'activité réalisés avec la MGD1 native ou mutée sont cohérents avec ceux publiés précédemment (Dubots *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2013), à savoir une activité spécifique plus importante avec l'AP que le PG pour la MGD1 native. Dans le cas du mutant P189A, on observe une perte substantielle d'activité en présence d'AP (environ 50-60%), comparée à la protéine native, et une activité quasi nulle en présence de PG. Ce résultat conforte l'hypothèse de l'implication du résidu P189 dans la liaison au PG. Nous confirmons aussi la perte totale d'activité du mutant H155A.

Une grande partie de mes travaux de thèse ont porté sur l'étude des propriétés d'association de MGD1 et des mutants à des membranes modèles, à l'aide de la technique des monocouches de Langmuir. Ces expériences ont été conduites dans l'équipe du Prof. Agnès Girard-Egrot à l'ICBMS de Lyon, spécialiste de cette technique. Les interactions des protéines vis-à-vis de monocouches formées uniquement de PG ou de DAG, ou d'un mélange DAG-PG, suggèrent que les résidus P189 et H155 interagissent tous deux avec le PG. Ces résultats ont permis de proposer un mécanisme réactionnel inédit pouvant expliquer le rôle d'activateur du PG. Dans le nouveau modèle, le résidu P189, situé dans la grande boucle que l'on suppose impliquée dans la liaison à la membrane et à la capture du DAG, devrait par son interaction avec le PG contribuer à l'ancrage de MGD1 dans la membrane. Cette étape permettrait de rapprocher le résidu H155 du PG et de favoriser leur interaction. Un système de relai de charge acide-base est ainsi créé, sous la forme d'une dyade catalytique PG-His qui facilite la déprotonation par le résidu H155 du groupement OH de l'accepteur DAG, ayant pour conséquence l'augmentation de la nucléophilie du DAG lors du mécanisme réactionnel de type S_N2 . Ce modèle implique également qu'une molécule de DAG soit co-localisée avec une molécule de PG, renforçant ainsi l'hypothèse que la grande région flexible du domaine N-terminal contribue à la fois à l'ancrage de MGD1 à la membrane et à la capture du DAG et du PG. Ce mécanisme proposé est également cohérent avec les études antérieures démontrant que l'interaction de MGD1 avec la membrane est favorisée par les interactions électrostatiques (Sarkis *et al.*, 2014).

J'ai également mis en place, durant mon doctorat, un nouveau test d'activité, basé sur la technique de Langmuir, qui présente l'avantage de pouvoir faire la distinction entre la capacité de liaison de MGD1 à la membrane et sa capacité à transférer un galactose sur son accepteur DAG. Il s'agit du premier exemple de synthèse d'un galactolipide sur une membrane biomimétique formée d'un mélange DAG-PG. Cette stratégie pourrait être généralisée pour

examiner la liaison et le comportement enzymatique d'autres enzymes liées à la membrane interfaciale, comme démontré précédemment pour les lipases (Cavalier *et al.*, 1999).

Mes travaux de thèse ont permis de progresser dans la compréhension du mécanisme d'activation de MGD1 par le PG. D'autres lipides anioniques sont capables de remplacer le PG, notamment l'AP et le SQDG. Concernant le SQDG, nos résultats d'activité sur le mutant P189A suggèrent que ce glycolipide se fixe sur le même site que le PG, ce qui impliquerait un mécanisme d'activation similaire. Le mécanisme d'activation par l'AP reste encore à déterminer. Ce lipide est présent à l'état de traces dans les membranes chloroplastiques. Par ailleurs, il a été démontré que l'AP est un activateur allostérique de MGD1 et c'est aussi une molécule signal chez la plante au carrefour de nombreuses voies de synthèse de lipides. L'obtention de nouveaux complexes de la protéine avec ses ligands naturels par cristallisation est une piste à privilégier. D'autres approches structurales peuvent être envisagées. Des expériences en collaboration avec l'Institut Laue-Langevin (ILL) situé à Grenoble sont en cours, avec l'utilisation de l'instrument FIGARO. Ces expériences utilisent la technique des monocouches de Langmuir en travaillant avec une protéine deutérée afin d'utiliser la réflectométrie neutronique pour examiner la manière dont l'interface reflète les neutrons pour fournir des informations sur son organisation, son épaisseur, sa composition et sa rugosité. Différentes compositions de monocouches vont être étudiées. Nous espérons ainsi obtenir de nouvelles informations concernant MGD1 et son organisation au sein d'une monocouche lipidique. Grâce à une collaboration avec le Dr Olga Makshakova (Kazan, Russie) et le Dr Serge Pérez du Cermav, des essais de simulation utilisant la dynamique moléculaire sont également tentés pour proposer un modèle d'interaction de MGD1 avec des membranes modèles. Cette approche sera également utilisée pour identifier les sites potentiels de liaison de MGD1 à l'AP. L'identification de ces sites régulateurs permettrait d'entreprendre des expériences *in planta* afin de mieux comprendre la régulation de la biosynthèse des galactolipides dans un contexte physiologique.

ANNEXES

- I. Mini Review: Do galactolipid synthases play a key role in the biogenesis of chloroplast membranes of higher plants?**



Do Galactolipid Synthases Play a Key Role in the Biogenesis of Chloroplast Membranes of Higher Plants?

Joana Rocha^{1,2}, Milène Nitenberg^{1,2}, Agnès Girard-Egrot³, Juliette Jouhet^{1,4},
Eric Maréchal^{1,4}, Maryse A. Block^{1,4} and Christelle Breton^{1,2*}

¹ Université Grenoble Alpes, Grenoble, France, ² CERMAV, CNRS, Grenoble, France, ³ GEMBAS Team, ICBMS, UMR 5246 CNRS, University of Lyon, Lyon, France, ⁴ LPCV, UMR 5168 CNRS/CEA/INRA/UGA, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Benoit Schoefs,
The University of Maine, France

Reviewed by:

Koichi Kobayashi,
The University of Tokyo, Japan
Agnieszka Mostowska,
University of Warsaw, Poland

*Correspondence:

Christelle Breton
breton@cermav.cnrs.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 25 November 2017

Accepted: 23 January 2018

Published: 08 February 2018

Citation:

Rocha J, Nitenberg M,
Girard-Egrot A, Jouhet J,
Maréchal E, Block MA and Breton C
(2018) Do Galactolipid Synthases Play
a Key Role in the Biogenesis
of Chloroplast Membranes of Higher
Plants?. *Front. Plant Sci.* 9:126.
doi: 10.3389/fpls.2018.00126

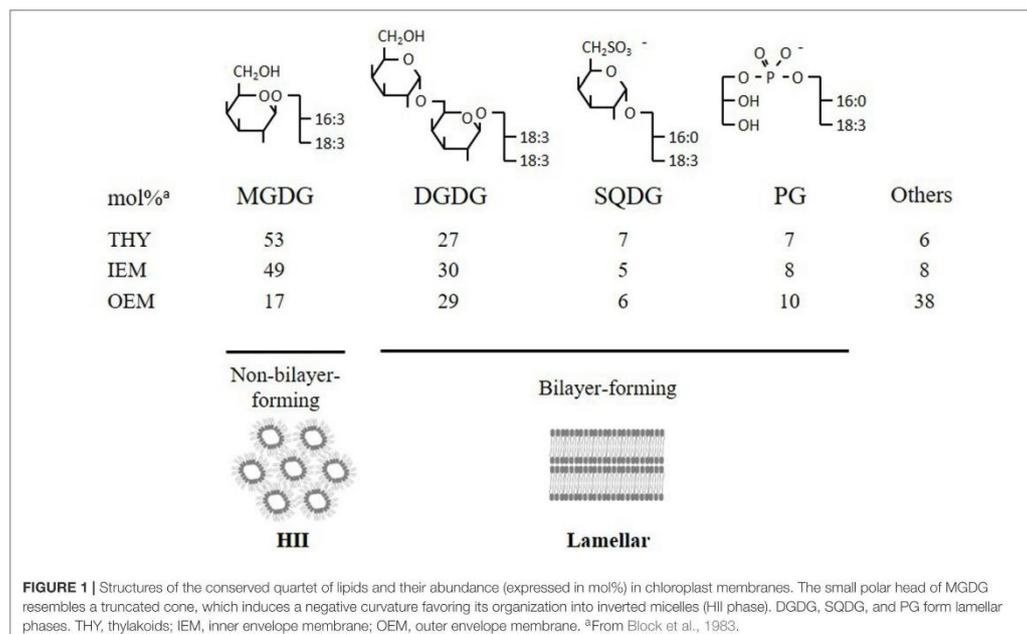
A unique feature of chloroplasts is their high content of the galactolipids monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), which constitute up to 80% of their lipids. These galactolipids are synthesized in the chloroplast envelope membrane through the concerted action of galactosyltransferases, the so-called 'MGDG synthases (MGDs)' and 'DGDG synthases (DGDs),' which use uridine diphosphate (UDP)-galactose as donor. In Arabidopsis leaves, under standard conditions, the enzymes MGD1 and DGD1 provide the bulk of galactolipids, necessary for the massive expansion of thylakoid membranes. Under phosphate limited conditions, plants activate another pathway involving MGD2/MGD3 and DGD2 to provide additional DGDG that is exported to extraplastidial membranes where they partly replace phospholipids, a phosphate-saving mechanism in plants. A third enzyme system, which relies on the UDP-Gal-independent GGGT (also called SFR2 for SENSITIVE TO FREEZING 2), can be activated in response to a freezing stress. The biosynthesis of galactolipids by these multiple enzyme sets must be tightly regulated to meet the cellular demand in response to changing environmental conditions. The cooperation between MGD and DGD enzymes with a possible substrate channeling from diacylglycerol to MGDG and DGDG is supported by biochemical and biophysical studies and mutant analyses reviewed herein. The fine-tuning of MGDG to DGDG ratio, which allows the reversible transition from the hexagonal II to lamellar α phase of the lipid bilayer, could be a key factor in thylakoid biogenesis.

Keywords: galactolipids, MGDG, DGDG, chloroplast, biosynthesis, Arabidopsis

INTRODUCTION

Photosynthetic membranes, or thylakoids, have a unique lipid composition that has been remarkably conserved from cyanobacteria to chloroplast-containing eukaryotes (**Figure 1**). The bulk of lipids is composed of the non-phosphorous and uncharged galactoglycerolipids monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), which represent up to 80% of total lipids (Block et al., 1983). Other lipids mostly consist of the anionic

Abbreviations: DGDG, digalactosyldiacylglycerol; IEM, inner envelope membrane; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; OEM, outer envelope membrane; PA, phosphatidic acid; PG, phosphatidylglycerol; SQDG, sulfoquinovosyl diacylglycerol.



sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) and phosphatidylglycerol (PG). MGDG is exclusively found in plastids, but DGDG can also be found in non-plastidial membranes, under specific conditions such as phosphate (Pi) deprivation, where it can substitute phospholipids (Härtel et al., 2000; Jouhet et al., 2004; Andersson et al., 2005). Galactolipids are believed to play essential roles in the light-dependent conversion of prolamellar bodies to thylakoid membranes in germinating seeds and in the dynamic organization of highly stacked grana membranes and photosynthetic machinery in response to light variations (Fujii et al., 2017; Gabruk et al., 2017). MGDG and DGDG are also known to stabilize the photosystem protein complexes in chloroplasts (Jones, 2007; Mizusawa and Wada, 2012; Kobayashi, 2016).

The MGDG and DGDG have also a major role in determining the physicochemical properties of thylakoid membranes. MGDG, which accounts for half of the total lipids, is a 'non-bilayer forming lipid' due to its cone-like shape, whereas the three other major components DGDG, SQDG, and PG are 'bilayer-forming lipids' (Figure 1). Maintaining a constant MGDG/DGDG ratio in thylakoid membranes (at least under standard growth conditions) seems crucial for the stability and functional integrity of photosynthetic membranes (Dörmann and Benning, 2002).

The efficiency of light energy capture and its conversion relies on the rapid expansion of thylakoids, thus requiring an effective and efficient system for providing the bulk of galactolipids. In Arabidopsis, the four major lipid components of photosynthetic membranes are synthesized in the chloroplast envelope (Boudière

et al., 2014; Kobayashi, 2016). DAG is the direct precursor for galactolipid formation and it can be produced within the chloroplast via the 'prokaryotic' pathway or from extra-plastidial phosphatidylcholine (PC) via the 'eukaryotic' pathway in the ER (Siebertz et al., 1979; Browse et al., 1986). The flux of DAG must therefore be tightly controlled to meet the dramatic demand of the chloroplast without adversely impacting the needs of other cell membranes.

Although galactolipids represent the major lipid components of oxygenic photosynthetic organisms, their biosynthesis differs between cyanobacteria and plants (Awai, 2016). In plants, MGDG synthesis is carried out by MGDG synthases (MGD), which transfer a galactose residue from uridine diphosphate (UDP)- α -D-galactose (UDP-Gal) to the *sn*-3 position of diacylglycerol (DAG), to form Gal β -DAG (MGDG). In cyanobacteria, MGDG is formed in two steps. The first step involves a glucosyltransferase, which transfers a glucose residue from UDP- α -D-glucose to DAG to yield Glc β -DAG (MGLcDG) (Awai et al., 2006). In a second step, an epimerase converts the glucose moiety of MGLcDG to galactose, yielding MGDG (Awai et al., 2014). DGDG biosynthesis occurs by the same general mechanism in plants and in cyanobacteria, although using distantly related enzymes (Awai et al., 2007; Sakurai et al., 2007). The reaction is catalyzed by DGDG synthases that transfer a galactose from UDP-Gal to MGDG to produce Gal α 1,6Gal β -DAG (DGDG).

These gluco/galactolipid synthases belong to the large glycosyltransferase (GT) family. The transfer of the monosaccharide to the acceptor is regio- and stereo-specific. GTs

can be classified as retaining or inverting enzymes depending on the stereochemical issue of the transfer reaction (i.e., retention or inversion of the anomeric configuration of the transferred sugar). Another classification has been proposed that groups GTs into families based on amino acid sequence similarities, i.e., CAZy database¹. The same fold and reaction mechanism are expected to occur within one GT family. The database currently comprises ~340,000 entries divided into ~100 GT families (designated GTx, x being the family number). Despite the considerable diversity of GT sequences and function, the three-dimensional structure of GTs is remarkably conserved since only two types of folds (designated as GT-A and GT-B) have been described to date for all nucleotide sugar dependent GTs (Breton et al., 2012). The GT-A and GT-B topologies are variations around a common $\alpha/\beta/\alpha$ scaffold, the so-called 'Rossmann fold.' Despite the similarities of their folds, GT-A and GT-B enzymes are unrelated and they probably evolved independently (Hashimoto et al., 2010). GTs are also characterized by an amazing conformational plasticity, which may explain their tremendous potential for accommodating a myriad of acceptor substrates (Albesa-Jové and Guerin, 2016). The gluco- and galactolipid synthases that have been described above fall into three GT families: the MGDG and DGDG synthases belong to GT28 (inverting) and GT4 (retaining), respectively, where members of both families are predicted to adopt a GT-B fold. Surprisingly, the bacterial MGLcDG synthase belongs to the inverting GT2 family, and is expected to adopt a GT-A fold. Because it is widely accepted that plastids in plants and algae originate from an ancestral cyanobacteria, the existence of two different pathways for MGDG synthesis involving two unrelated GTs raises the question of the importance of conserving MGDG in photosynthetic membranes and on the evolution history of eukaryotic MGDG synthases. The hypothesis of a lateral transfer of a MGDG synthase gene from an ancestral Chloroflexi has been proposed (Yuzawa et al., 2012).

In the past years, a number of reviews have been published covering various aspects of galactoglycerolipid metabolism and chloroplast biogenesis both in cyanobacteria and in plants (Boudière et al., 2014; Petroustos et al., 2014; Awai, 2016; Bastien et al., 2016; Kobayashi, 2016). The present review will focus on recent developments in the biochemical and structural characterization of galactolipid synthases and of their products MGDG and DGDG, with a special focus on Arabidopsis enzymes, and how these data can be integrated in the broader context of chloroplast membrane biogenesis.

THE MGDG SYNTHASES

The MGDG synthase activity was first ascribed to a minor membrane protein localized in the chloroplast envelope (Maréchal et al., 1994a,b). Shimojima et al. (1997) first succeeded in the cloning of the MGDG synthase from cucumber. This has led to the identification in the Arabidopsis genome of a multigenic family of MGDG synthases that were designated

¹<http://www.cazy.org/>

as type A (or MGD1) and type B (or MGD2 and MGD3) (Awai et al., 2001). The type A protein is characterized by the presence at its N-terminus of a cleavable chloroplast transit peptide of ~100 amino acids, whereas type B displays a short addressing sequence of ~30 residues. MGD1 is a monotopic membrane protein that was shown to localize to the outer leaflet of the inner envelope membrane (IEM) (Miège et al., 1999; Xu et al., 2005; Vojta et al., 2007). Whether the MGD1 protein faces the stromal side or the intermembrane space of the IEM is still a matter of debate. This assumption has to be revisited with the demonstration that an epimerase catalyzing the conversion of UDP-Glucose into UDP-Gal in the chloroplast stroma is essential for the biosynthesis of galactolipids in rice (Li et al., 2011). This suggests that the UDP-Gal substrate for MGD1 can be produced *in situ* in chloroplasts and that MGD1 may have access to the IEM stroma side. MGD1 was shown to be the most active isoform responsible for the synthesis of the bulk of MGDG needed for the massive expansion of thylakoids. Indeed, a MGD1 knock-out mutant (*mgd1-2*) could only grow on sucrose-supplemented media and demonstrated a complete lack of chlorophyll as well as a growth arrest after embryogenesis (Kobayashi et al., 2007).

The other Arabidopsis MGD isoforms (MGD2, MGD3) are mostly produced in non-photosynthetic tissues and, more specifically, they are induced in response to phosphate shortage (Awai et al., 2001; Kobayashi et al., 2009). In contrast to MGD1, MGD2 and MGD3 are localized in the outer leaflet of the outer envelope membrane (OEM) (Awai et al., 2001). Knock-out mutants of MGD2 and MGD3 have no striking phenotype in standard growth conditions (Kobayashi et al., 2009).

The MGD1 has been the most extensively studied galactolipid synthase. Biochemical data obtained on the purified spinach enzyme showed a sequential, random or ordered, mechanism with independent donor and acceptor binding sites (Maréchal et al., 1994a). Major advance was recently obtained in the production and crystallization of the catalytic domain of MGD1 (Rocha et al., 2013, 2016). The recombinant protein produced in *Escherichia coli* is fully active but it behaves as a monomer in solution and not as a dimer as previously proposed (Miège et al., 1999). As expected for GTs belonging to family GT28, the MGD1 protein adopts a GT-B fold (Rocha et al., 2016). The GT-B fold is characterized by two Rossmann-type domains with the catalytic site between the two domains. Perhaps the most striking feature in MGD1 was the presence of a long and flexible region of ~50 amino acids residues in the N-terminal domain. This region seems to contribute to the anchoring MGD1 in the membrane and is essential to capture the DAG acceptor (Rocha et al., 2016). MGD1 requires anionic lipids, such as phosphatidic acid (PA) and PG for its activity (Coves et al., 1988; Dubots et al., 2010). Interestingly, it was shown that PA and PG proceed through different mechanisms, thus suggesting distinct binding sites (Dubots et al., 2010). Mutational studies indicated that PG binds to MGD1 in a region close to the DAG-binding site (Rocha et al., 2016). When tested on biomimetic langmuir monolayers, MGD1 showed a contrasted behavior toward MGDG and DGDG (Sarkis et al., 2014). The reaction product MGDG exerts a positive effect on MGD1, facilitating its binding to the membrane, whereas DGDG has a negative effect and tends

to exclude the enzyme. These opposite effects illustrate the importance of the MGDG/DGDG ratio in maintaining the enzyme bound to the membrane and they also suggest that MGD1 localizes to specific microdomains (see below). Particularly, in presence of MGDG, MGD1 tends to self-organize forming elongated and reticulated lipoproteic structures (Sarkis et al., 2014). This type of organization is believed to optimize the massive production of MGDG needed for thylakoid expansion and, possibly, to contribute to the scaffolding of prothylakoids originating from the IEM (Bastien et al., 2016). MGD1 also demonstrated high affinity for DAG and PG monolayers (Sarkis et al., 2014). PG which represents ~10% of total lipids of IEM probably plays an important role in MGD1 binding. Its role as MGD1 activator and the proximity of PG and DAG binding sites suggest that PG could help the enzyme to trap its DAG substrate. The role of PA in MGD1 activity is less clear. PA is barely detectable in chloroplast membranes but it acts as an allosteric activator of MGD1 (Dubots et al., 2010) and is the direct precursor for DAG of prokaryotic origin. A conformational change of the bilobal MGD1 enzyme may explain this allosteric effect, or alternatively, PA may induce protein dimerization. It is clear that PA plays a central role in the metabolism of lipids of photosynthetic membrane (Dubots et al., 2012).

THE DGDG SYNTHASES

In Arabidopsis, two genes coding for DGDG synthases have been identified and characterized (Dörmann et al., 1999; Kelly and Dörmann, 2002). DGD1 is responsible for the synthesis of the bulk of DGDG (>90%) in chloroplasts under normal growth conditions, whereas DGD2 only produces minor amounts of DGDG (Kelly et al., 2003). Only the part of MGDG with a eukaryotic signature is used by DGDG synthases to form DGDG. A *dgd1* mutant shows severe dwarfism and loss of photosynthesis efficiency (Dörmann et al., 1995), whereas *dgd2* mutants were much less affected (Kelly et al., 2003). Although the expression of both DGD1 and DGD2 is induced during phosphate deprivation, DGD2 seems to be the major enzyme to provide DGDG for the extraplastidial membranes (Härtel et al., 2000; Kelly and Dörmann, 2002). Both enzymes are localized to the OEM (Froehlich et al., 2001; Kelly et al., 2003), with their catalytic domains oriented to the cytosolic side, thus raising the question of the trafficking of their substrate MGDG synthesized in the IEM. DGD1 seems to use MGDG formed by MGD1 in the IEM whereas DGD2, under Pi shortage, preferably uses MGDG generated by MGD2/MGD3 in the OEM (Benning, 2009).

The catalytic domain of DGDG synthases is predicted to adopt a similar GT-B fold as MGD1. DGD1 has a unique feature that is not observed in DGD2. The catalytic domain is preceded by a large N-terminal region comprising about 330 amino acids. This domain does not contribute to the galactosyltransferase reaction but is required for insertion of DGD1 into the OEM (Froehlich et al., 2001). Very recently, the role of this N-terminal extension (N-DGD1), predicted all- α with coiled-coil domains, was addressed

(Kelly et al., 2016). Using a series of chimeric constructs to complement a *dgd1* mutant, the authors demonstrated that N-DGD1 was essential for enabling galactolipid transfer between envelope membranes. Also, N-DGD1 mediates a PA-dependent membrane fusion *in vitro*. These data represent a breakthrough in our understanding of MGDG and DGDG trafficking between IEM and OEM. In the case of DGD2, it was proposed that the enzyme interacts with the membrane through its N-terminal domain, via interactions with negatively charged lipids (Szpryngiel et al., 2011), but also with part of its C-terminal domain which could act as a lipid sensing switch (Szpryngiel and Mäler, 2016).

Another pathway for DGDG synthesis is mediated by the GGGT, an enzyme that transfers a galactose from one molecule of MGDG to another MGDG with concomitant release of a DAG moiety (Moellering and Benning, 2011). However, it must be noted that DGDG produced is different with respect to the glycosidic linkage formed ($\beta\beta$ -DGDG instead of $\alpha\beta$ -DGDG). Although the GGGT enzyme was found localized to the OEM, it does not contribute to the net synthesis of galactolipids in normal growth conditions and during Pi deprivation (Kelly et al., 2003). GGGT also demonstrates a processive activity leading to the formation of tri- and tetra-galactolipids. The role of GGGT has been enigmatic for many years. Recently, this GGGT was shown to be involved in freezing tolerance (Moellering et al., 2010). The GGGT encoding gene has been identified as SENSITIVE TO FREEZING 2 (SFR2) in Arabidopsis. SFR2 is not vital for normal growth and development but the freezing sensitivity of the *sfr2* mutant suggested that the enzyme was involved in lipid remodeling of chloroplast membranes. Changing the ratio of bilayer-/non-bilayer-forming lipids to favor the formation of lamellar bilayers is a mechanism to stabilize membranes during freezing stress. One can reasonably speculate a role of SFR2 as a sensor of biophysical and compositional changes in membranes, triggering lipid remodeling in response to abiotic stress.

ROLES OF GALACTOLIPIDS IN THE STRUCTURE AND BIOGENESIS OF THYLAKOIDS

The lipid composition of chloroplast membranes has been remarkably conserved through evolution from cyanobacteria to plants (Petroustos et al., 2014). Particularly the MGDG/DGDG ratio appears to be highly stable (Boudière et al., 2014). The hypothesis of a specific contribution of galactolipids in the organization of thylakoid membranes as stacked flattened cisternae that can pile up to form grana was steadily addressed. This type of organization appears crucial to ensure enough density of photosystems to capture light energy. By reconstituting membranes made of natural thylakoid lipid extracts, it was found that the lipid mixture can self-organize as a membrane bilayer and can reversibly switch from the hexagonal II (HII) to the lamellar ($L\alpha$) phase (Demé et al., 2014). The transition can be fine-tuned by the lipid composition, particularly the MGDG/DGDG ratio, and hydration. These studies highlighted

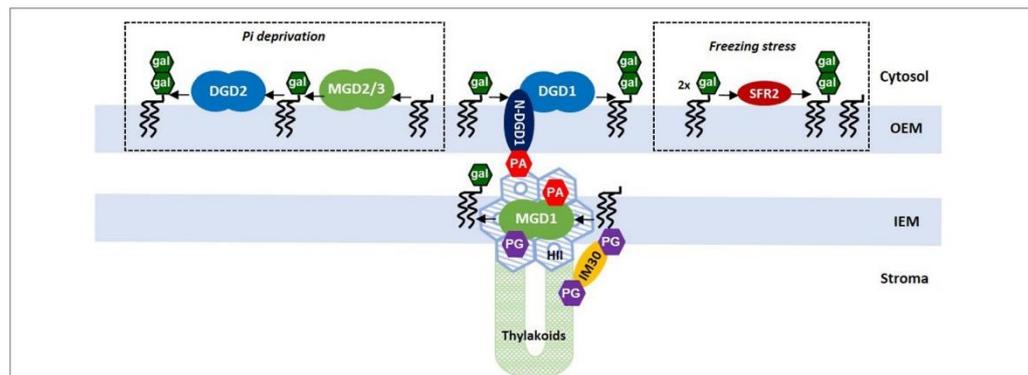


FIGURE 2 | Biosynthesis of galactolipids in the chloroplast envelope membranes in Arabidopsis. The three enzyme systems are represented. The main pathway is mediated by MGD1 and DGD1 which provide the bulk of galactolipids for all chloroplast membranes in normal growth conditions. MGD2/3 and DGD2 are activated in response to Pi deprivation, and SFR2 is activated in response to a freezing stress. Flux of galactolipids between IEM and OEM are facilitated by PA-mediated contacts with N-DGD1 (as proposed by Kelly et al., 2016). The MGD1-MGDG association in the IEM forms a HII platform that allows the transit of galactolipids to newly synthesized thylakoids through a non-lamellar/non-vesicular process (as proposed by Bastien et al., 2016). This process might involve other cellular partners such as the IM30/VIPP1 protein (Hennig et al., 2015). Can MGD1, inserted in a locally non-lamellar microdomain, have access on one side or the other side of the IEM, or even both, has yet to be determined.

the critical role of the bilayer-forming DGDG, described as a galactolipid zipper (Demé et al., 2014), in membrane stacking via hydrogen bonds between polar heads of adjacent bilayers. These interactions also contribute to balance the repulsive electrostatic effects of the anionic lipids PG and SQDG, thus favoring grana stacking (Demé et al., 2014; Kanduč et al., 2017). The biophysical properties of galactolipids could explain the conservation of thylakoid membrane composition throughout evolution.

Thylakoid biogenesis results in etioplasts from light activation of the cubic phase tubular structure of prolamellar bodies where a critical level of MGDG is required for the formation of the photoactive protochlorophyllide-LPOR-NADPH complex and its oligomerization (Fujii et al., 2017; Gabruk et al., 2017). Alternatively, in most types of plastids, thylakoid biogenesis results also from formation of *de novo* structures from the IEM. Different scenarios have been proposed for formation from IEM, including the budding of vesicles or flattened invaginations from the IEM and HII intermediate structures (Bastien et al., 2016). The unique localization of MGD1 in the IEM and the propensity of MGDG to self-organize in inverse micelles (HII) rather than in bilayers are important clues in the context of thylakoid biogenesis. A HII \leftrightarrow L α phase transition triggered by subtle variations in the MGDG/DGDG ratio, as a result of favored or disfavored MGD1 binding to the IEM, can be a driving force that governs thylakoid membrane expansion. To support this assumption, membrane connections were observed between the IEM and thylakoids in the severe genetic background of *mgd1-2* mutant (Kobayashi et al., 2007), and in wild-type Arabidopsis plants treated with galvestin-1, an inhibitor of MGDG synthases (Botté et al., 2011). Based on these observations, a non-lamellar/non-vesicular model has been proposed in which the transit of lipids between the IEM and thylakoids operates, at

least in the early stage of thylakoid biogenesis, through HII regions enriched in MGD1-MGDG (Bastien et al., 2016). This model does not exclude the contribution of other cellular partners such as IM30/VIPP1, a protein triggering membrane fusion in chloroplasts, and which was shown to bind to anionic lipids (i.e., PG and SQDG) (Hennig et al., 2015).

This review highlights the unique and irreplaceable roles of MGDG and DGDG, which have very contrasted biophysical properties, in the biogenesis and architecture of chloroplast membranes. Figure 2 gives an overview of our current knowledge on galactolipid synthases, particularly their localization in the chloroplast envelope, and highlights the central roles of MGD1 and DGD1 in regulating the flux of galactolipids between IEM and OEM, and between IEM and thylakoid membranes. The fine-tuning of these enzymes, by controlling HII \leftrightarrow L α phase transitions, appears important for nascent thylakoid development, for membrane-membrane interactions and the development of flattened cisternae. This also raises the major but still unresolved question of the coexistence of HII+L α phases. In particular, the location and regulation of MGDG-rich HII regions, required for the functional violaxanthin/astaxanthin cycle (Goss et al., 2017), and the relation with domains containing the photosystems, is clearly a major puzzling question for the future.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The subject was the result of a fruitful collaboration involving all co-authors. JR, MN, AG-E, JJ, EM, MB, and CB agreed to contribute this review and participated in delineating the content of the topic, and in the writing and preparation of figures.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors were supported by the French National Research Agency (ANR-10-Blan-1524 ReGal, ANR-13-ADAP-0008

Reglisse, ANR-13-BSV8-0011, and ANR-10-LABEX-04 GRAL Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology); Grenoble Alpes (AGIR 2015); and Communauté Université Grenoble Alpes (Cross-Disciplinary project Glyco@Alps).

REFERENCES

- Albesa-Jové, D., and Guerin, M. E. (2016). The conformational plasticity of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 40, 23–32. doi: 10.1016/j.sbi.2016.07.007
- Andersson, M. X., Larsson, K. E., Tjellstrom, H., Liljenberg, C., and Sandelius, A. S. (2005). The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 280, 27578–27586. doi: 10.1074/jbc.M503273200
- Awai, K. (2016). “Thylakoid development and galactolipid synthesis in cyanobacteria,” in *Lipids in Plant and Algae Development: Subcellular Biochemistry*, Vol. 86, eds Y. Nakamura and Y. Li-Bisson (Cham: Springer), 85–101. doi: 10.1007/978-3-319-25979-6_4
- Awai, K., Kakimoto, T., Awai, C., Kaneko, T., Nakamura, Y., Takamiya, K., et al. (2006). Comparative genomic analysis revealed a gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in cyanobacteria. *Plant Physiol.* 141, 1120–1127. doi: 10.1104/pp.106.082859
- Awai, K., Maréchal, E., Block, M. A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., et al. (2001). Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10960–10965. doi: 10.1073/pnas.181331498
- Awai, K., Ohta, H., and Sato, N. (2014). Oxygenic photosynthesis without Galactolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 13571–13575. doi: 10.1073/pnas.1403708111
- Awai, K., Watanabe, H., Benning, C., and Nishida, I. (2007). Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation. *Plant Cell Physiol.* 48, 1517–1523. doi: 10.1093/pcp/pcm134
- Bastien, O., Botella, C., Chevalier, F., Block, M. A., Jouhet, J., Breton, C., et al. (2016). New insights on thylakoid biogenesis in plant cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 323, 1–30. doi: 10.1016/bs.icmb.2015.12.001
- Benning, C. (2009). Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 71–91. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113414
- Block, M. A., Dorne, A.-J., Joyard, J., and Douce, R. (1983). Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. 2. Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258, 3281–3286.
- Botté, C. Y., Deligny, M., Rocchia, A., Bonneau, A. L., Saïdani, N., Hardré, H., et al. (2011). Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Chem. Biol.* 7, 834–842. doi: 10.1038/nchembio.658
- Boudière, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., et al. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 470–480. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.09.007
- Breton, C., Fournel-Gigleux, S., and Palcic, M. M. (2012). Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 540–549. doi: 10.1016/j.sbi.2012.06.007
- Browse, J., Warwick, N., Somerville, C. R., and Slack, C. R. (1986). Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the 16:3 plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 235, 25–31. doi: 10.1042/bj2350025
- Coves, J., Joyard, J., and Douce, R. (1988). Lipid requirement and kinetic studies of solubilized UDP-galactose:diacylglycerol galactosyltransferase activity from spinach chloroplast envelope membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4966–4970. doi: 10.1073/pnas.85.14.4966
- Demé, B., Cataye, C., Block, M. A., Maréchal, E., and Jouhet, J. (2014). Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J.* 28, 3373–3383. doi: 10.1096/fj.13-247395
- Dörmann, P., Balbo, I., and Benning, C. (1999). *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science* 284, 2181–2184. doi: 10.1126/science.284.5423.2181
- Dörmann, P., and Benning, C. (2002). Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.* 7, 112–118. doi: 10.1016/S1360-1385(01)02216-6
- Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I., and Benning, C. (1995). Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell* 7, 1801–1810. doi: 10.1105/tpc.7.11.1801
- Dubots, E., Audry, M., Yamaryo, Y., Bastien, O., Ohta, H., Breton, C., et al. (2010). Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 285, 6003–6011. doi: 10.1074/jbc.M109.071928
- Dubots, E., Botté, C., Boudière, L., Yamaryo-Botté, Y., Jouhet, J., Maréchal, E., et al. (2012). Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie* 94, 86–93. doi: 10.1016/j.biochi.2011.03.012
- Froehlich, J. E., Benning, C., and Dörmann, P. (2001). The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 31806–31812. doi: 10.1074/jbc.M104652200
- Fujii, S., Kobayashi, K., Nagata, N., Masuda, T., and Wada, H. (2017). Monogalactosyldiacylglycerol facilitates synthesis of photoactive protochlorophyllide in etioplasts. *Plant Physiol.* 174, 2183–2198. doi: 10.1104/pp.17.00304
- Gabruk, M., Mysliwa-Kurzdziel, B., and Kruk, J. (2017). MGDG, PG and SQDG regulate the activity of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase. *Biochem. J.* 474, 1307–1320. doi: 10.1042/BCJ20170047
- Goss, R., Greifenhagen, A., Bergner, J., Volke, D., Hoffmann, R., Wilhelm, C., et al. (2017). Direct isolation of a functional violaxanthin cycle domain from thylakoid membranes of higher plants. *Planta* 245, 793–806. doi: 10.1007/s00425-016-2645-9
- Härtel, H., Dörmann, P., and Benning, C. (2000). DGD1-independent biosynthesis of extraplasmidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10649–10654. doi: 10.1073/pnas.180320497
- Hashimoto, K., Madej, T., Bryant, S. H., and Panchenko, A. R. (2010). Functional states of homoooligomers: insights from the evolution of glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 399, 196–206. doi: 10.1016/j.jmb.2010.03.059
- Hennig, R., Heidrich, J., Saur, M., Schmäser, L., Roeters, S. J., Hellmann, N., et al. (2015). IM30 triggers membrane fusion in cyanobacteria and chloroplasts. *Nat. Commun.* 6:7018. doi: 10.1038/ncomms8018
- Jones, M. R. (2007). Lipids in photosynthetic reaction centres: structural roles and functional holes. *Prog. Lipid Res.* 46, 56–87. doi: 10.1016/j.plipres.2006.06.001
- Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bliigny, R., Joyard, J., and Block, M. A. (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* 167, 863–874. doi: 10.1083/jcb.200407022
- Kanduč, M., Schlaich, A., de Vries, A. H., Jouhet, J., Maréchal, E., Demé, B., et al. (2017). Tight cohesion between glycolipid membranes results from balanced water-headgroup interactions. *Nat. Commun.* 8:14899. doi: 10.1038/ncomms14899
- Kelly, A. A., and Dörmann, P. (2002). *DGD2*, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J. Biol. Chem.* 277, 1166–1173. doi: 10.1074/jbc.M110066200
- Kelly, A. A., Froehlich, J. E., and Dörmann, P. (2003). Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis*

- reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell* 15, 2694–2706. doi: 10.1105/tpc.016675
- Kelly, A. A., Kalisch, B., Hölzl, G., Schulze, S., Thiele, J., Melzer, M., et al. (2016). Synthesis and transfer of galactolipids in the chloroplast envelope membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 10714–10719. doi: 10.1073/pnas.1609184113
- Kobayashi, K. (2016). Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J. Plant Res.* 129, 565–580. doi: 10.1007/s10265-016-0827-y
- Kobayashi, K., Awai, K., Nakamura, M., Nagatani, A., Masuda, T., and Ohta, H. (2009). Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant J.* 57, 322–331. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03692.x
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., and Ohta, H. (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 17216–17221. doi: 10.1073/pnas.0704680104
- Li, C., Wang, Y., Liu, L., Hu, Y., Zhang, F., Mergen, S., et al. (2011). A rice plastidial nucleotide sugar epimerase is involved in galactolipid biosynthesis and improves photosynthetic efficiency. *PLoS Genet.* 7:e1002196. doi: 10.1371/journal.pgen.1002196
- Maréchal, E., Block, M. A., Joyard, J., and 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, M. A., Joyard, J., and Douce, R. (1994b). Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 5788–5798.
- Miège, C., Maréchal, E., Shimoyama, M., Awai, K., Block, M. A., Ohta, H., et al. (1999). Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur. J. Biochem.* 265, 990–1001. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00801.x
- Mizusawa, N., and Wada, H. (2012). The role of lipids in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 194–208. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.04.008
- Moellering, E. R., and Benning, C. (2011). Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. *Trends Plant Sci.* 16, 98–107. doi: 10.1016/j.tplants.2010.11.004
- Moellering, E. R., Muthan, B., and Benning, C. (2010). Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* 330, 226–228. doi: 10.1126/science.1191803
- Petroustos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L. J., Bastien, O., Rébeillé, F., 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. doi: 10.1016/j.plipres.2014.02.001
- Rocha, J., Audry, M., Pesce, G., Chazalet, V., Block, M. A., Maréchal, E., et al. (2013). Revisiting the expression and purification of MGD1, the major galactolipid synthase in Arabidopsis to establish a novel standard for biochemical and structural studies. *Biochimie* 95, 700–708. doi: 10.1016/j.biochi.2012.11.011
- Rocha, J., Sarkis, J., Thomas, A., Pitou, L., Radzimanowski, J., Audry, M., et al. (2016). Structural insights and membrane binding properties of MGD1, the major galactolipid synthase in plants. *Plant J.* 85, 622–633. doi: 10.1111/tpj.13129
- Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H., and Sato, N. (2007). Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Plant Physiol.* 145, 1361–1370. doi: 10.1104/pp.107.106781
- Sarkis, J., Rocha, J., Maniti, O., Jouhet, J., Vie, V., Block, M. A., et al. (2014). The influence of lipids on MGD1 membrane binding highlights novel mechanisms for galactolipid biosynthesis regulation in chloroplasts. *FASEB J.* 28, 3114–3123. doi: 10.1096/fj.14-250415
- Shimoyama, M., Ohta, H., Iwamatsu, A., Masuda, T., Shioi, Y., and Takamiya, K. (1997). Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 333–337. doi: 10.1073/pnas.94.1.333
- Siebertz, H. P., Heinz, E., Linscheid, M., Joyard, J., and Douce, R. (1979). Characterization of lipids from chloroplast envelopes. *Eur. J. Biochem.* 101, 429–438. doi: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb19736.x
- Szpyrgiel, S., Ge, C., Iakovleva, I., Georgiev, A., Lind, J., Wieslander, A., et al. (2011). Lipid interacting regions in phosphate stress glycosyltransferase atDGD2 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 50, 4451–4466. doi: 10.1021/bi200162f
- Szpyrgiel, S., and Måler, L. (2016). Insights into the membrane interacting properties of the C-terminal domain of the monotopic glycosyltransferase DGD2 in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 55, 6776–6786. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00559
- Vojta, L., Soll, J., and Böltner, B. (2007). Protein transport in chloroplasts - targeting to the intermembrane space. *FEBS J.* 274, 5043–5054. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06023.x
- Xu, C., Fan, J., Froehlich, J. E., Awai, K., and Benning, C. (2005). Mutation of the TG1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 3094–3110. doi: 10.1105/tpc.105.035592
- Yuzawa, Y., Nishihara, H., Haraguchi, T., Masuda, S., Shimoyama, M., Shimoyama, A., et al. (2012). Phylogeny of galactolipid synthase homologs together with their enzymatic analyses revealed a possible origin and divergence time for photosynthetic membrane biogenesis. *DNA Res.* 19, 91–102. doi: 10.1093/dnares/dsr044

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Rocha, Nitenberg, Girard-Egrot, Jouhet, Maréchal, Block and Breton. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II. Posters et Communications orales

1) Posters

- ✓ 23-27 mai 2016: Structural aspects and membrane binding properties of MGD1, the major galactolipid synthase in plants.
Joana Rocha, Milène Nitenberg, Eric Maréchal, Agnès Girard-Egrot, Maryse Block and Christelle Breton.
Prix du meilleur poster en Biologie - Congrès GFG (Groupe Français des Glycosciences)
Aussois, France

- ✓ 25 octobre 2016: Structural aspects and membrane binding properties of MGD1, the major galactolipid synthase in plants.
Joana Rocha, Milène Nitenberg, Eric Maréchal, Agnès Girard-Egrot, Maryse Block and Christelle Breton.
Journée scientifique du pôle CBS (Chimie-Biologie-Santé)
Grenoble, France

- ✓ mai 2017: Investigation of membrane binding properties and enzyme activity of MGD1, the major galactolipid synthase in plants, using Langmuir monolayer as a biomimetic membrane model.
Milène Nitenberg, Joana Rocha, Juliette Jouhet, Eric Maréchal, Agnès Girard-Egrot, Maryse A. Block & Christelle Breton.
Journée de l'IMBL (Institut Multidisciplinaire de Biochimie des lipides)
Grenoble, France

2) Communications orales

- ✓ 2-5 juillet 2017: Investigation of membrane binding properties and enzyme activity of a plant galactolipid synthase (MGD1), in a biomimetic membrane model.
Milène Nitenberg, Joana Rocha, Juliette Jouhet, Eric Maréchal, Agnès Girard-Egrot, Maryse A. Block & Christelle Breton.
8th European Symposium on Plants Lipids

Malmö, Suède

- ✓ 5-8 novembre 2017: Investigation of membrane binding properties and enzyme activity of a plant galactolipid synthase (MGD1), in a biomimetic membrane model.

Milène Nitenberg, Joana Rocha, Juliette Jouhet, Eric Maréchal, Agnès Girard-Egrot, Maryse A. Block & Christelle Breton.

Groupe d'Etudes des Membranes

Roscoff, France

- ✓ 17 novembre 2017: Biogenesis of photosynthetic membranes: structure-function study of mgd1, a galactolipid synthase from Arabidopsis.

Milène Nitenberg, Joana Rocha, Juliette Jouhet, Eric Maréchal, Agnès Girard-Egrot, Maryse A. Block & Christelle Breton.

5th glyco morning event (Glycoalps)

Grenoble, France

- ✓ 23-27 juillet 2018: Discrimination between binding capacity and catalytic activity of MGD1, a plant galactolipid synthase, by developing a new enzyme activity test in Langmuir monolayer.

Milène Nitenberg, Juliette Jouhet, Éric Maréchal, Maryse A. Block, Agnès Girard-Egrot & Christelle Breton.

17th International Conference on Organized Molecular Films

New York, Etats-Unis

III. Tableaux des transitions et chromatogrammes

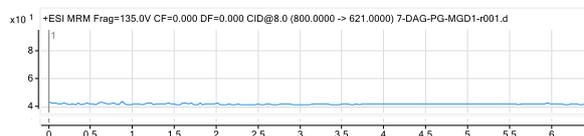
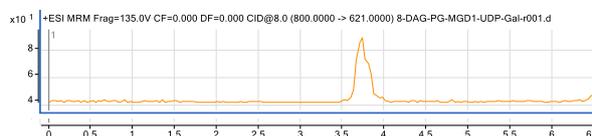
Ci-dessous sont répertoriées les transitions qui ont permis l'analyse des résultats issus des études de l'activité de la MGD1 en monocouche.

Les lipides ont été analysés par MRM (*multiple reaction monitoring*), c'est-à-dire que pour chaque molécule, une transition a été quantifiée correspondant à la perte de la tête polaire.

0 to 16 min										
MRM										
Compound Group	Compound Name	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
MGDG Arabido	MGDG-36-0	804	Widest	625	Unit	100	135	8	7	Positive
MGDG Arabido	MGDG-36-1	802	Widest	623	Unit	100	135	8	7	Positive
MGDG Arabido	MGDG-36-2	800	Widest	621	Unit	100	135	8	7	Positive
MGDG Arabido	MGDG-36-3	798	Widest	619	Unit	100	135	8	7	Positive
MGDG Arabido	MGDG-34-0	776	Widest	597	Unit	100	135	8	7	Positive
MGDG Arabido	MGDG-34-1	774	Widest	595	Unit	100	135	8	7	Positive
MGDG Arabido	MGDG-34-2	772	Widest	593	Unit	100	135	8	7	Positive
std DAG	DAG-18-0_22-6	686	Widest	385	Unit	100	135	16	7	Positive
std DAG	DAG-18-0_22-6	686	Widest	341	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-18-0_18-1	640	Widest	341	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-18-0_18-1	640	Widest	339	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-18-1_18-1	638	Widest	339	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-18-2_18-1	636	Widest	339	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-18-2_18-1	636	Widest	337	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-16-0_18-0	614	Widest	341	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-16-0_18-0	614	Widest	313	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-16-0_18-1	612	Widest	339	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-16-0_18-1	612	Widest	313	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-16-0_18-2	610	Widest	337	Unit	100	135	16	7	Positive
DAG arabido	DAG-16-0_18-2	610	Widest	313	Unit	100	135	16	7	Positive
16 to 40 min										
MRM										
Compound Group	Compound Name	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
std SQDG	SQDG-34-0	821	Widest	225	Unit	100	135	56	7	Negative
PG Arabido	PG-36-0	796	Widest	607	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-36-1	794	Widest	605	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-36-2	792	Widest	603	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-36-3	790	Widest	601	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-36-4	788	Widest	599	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-36-5	786	Widest	597	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-36-6	784	Widest	595	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-34-0	768	Widest	579	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-34-1	766	Widest	577	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-34-2	764	Widest	575	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-34-3	762	Widest	573	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-34-4	760	Widest	571	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-32-0	740	Widest	551	Unit	100	135	16	7	Positive
PG Arabido	PG-32-1	738	Widest	549	Unit	100	135	16	7	Positive

Ci-dessous, à gauche, un chromatogramme positif correspondant au pic d'éluion de la molécule d'intérêt, le MGDG 18 :1/18 :1 lorsque la monocouche est composée de DAG et de PG avec injection de la MGD1 et de l'UDP-Gal.

Ci-dessous, à droite, un chromatogramme négatif lorsque la monocouche est composée de DAG et de PG avec injection de la MGD1 sans l'UDP-Gal.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alban, C., Joyard, J., & Douce, R. (1989). Comparison of glycerolipid biosynthesis in non-green plastids from sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cells and cauliflower (*Brassica oleracea*) buds. *The Biochemical Journal*, *259*, 775–83.
- Albesa-Jové, D., & Guerin, M. E. (2016). The conformational plasticity of glycosyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology*, *40*, 23–32.
- Albesa-Jové, D., Sainz-Polo, M. Á., Marina, A., & Guerin, M. E. (2017). Structural Snapshots of α -1,3-Galactosyltransferase with Native Substrates: Insight into the Catalytic Mechanism of Retaining Glycosyltransferases. *Angewandte Chemie - International Edition*, *56*, 14853–14857.
- Andersson, M. X., Larsson, K. E., Tjellström, H., Liljenberg, C., & Sandelius, A. S. (2005). Phosphate-limited oat: The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 27578–27586.
- Andersson, M. X., Stridh, M. H., Larsson, K. E., Liljenberg, C., & Sandelius, A. S. (2003). Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Letters*, *537*, 128–132.
- Aronsson, H. (2008). The galactolipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) contributes to photosynthesis-related processes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, *1093–1095*.
- Awai, K. (2006). Comparative Genomic Analysis Revealed a Gene for Monoglucosyldiacylglycerol Synthase, an Enzyme for Photosynthetic Membrane Lipid Synthesis in Cyanobacteria. *Plant Physiology*, *141*, 1120–1127.
- Awai, K. (2016). Lipids in Plant and Algae Development (Vol. 86, pp. 85–101).
- Awai, K., Maréchal, E., Block, M. A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., ... Joyard, J. (2001). Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*, 10960–10965.
- Awai, K., Ohta, H., & Sato, N. (2014). Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*, 13571–13575.
- Awai, K., Watanabe, H., Benning, C., & Nishida, I. (2007). Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation. *Plant and Cell Physiology*, *48*, 1517–1523.
- Bastien, O., Botella, C., Chevalier, F., Block, M. A., Jouhet, J., Breton, C., ... Maréchal, E. (2016).

- New Insights on Thylakoid Biogenesis in Plant Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 323, 1–30.
- Benning, C. (2009). Mechanisms of Lipid Transport Involved in Organelle Biogenesis in Plant Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 71–91.
- Benson, A. A., & Maruo, B. (1958). Plant phospholipids I. Identification of the phosphatidyl glycerols. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 27, 189–195.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Block, M. A., Dorne, A.-J., Joyard, J., & Douce, R. (1983). Preparation and Characterization of Membrane Fractions Enriched in Outer and Inner Envelope Membranes from Spinach Chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 13281–13286.
- Boisselier, E., Calvez, P., Demers, E., Cantin, L., & Salessse, C. (2012). Influence of the Physical State of Phospholipid Monolayers on Protein Binding. *Langmuir*, 28, 9680–9688.
- Boisselier, E., Calvez, P., Demers, E., Cantin, L., & Salessse, C. (2013). Effect of oxidation of polyunsaturated phospholipids on the binding of proteins in monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 109–114.
- Bolam, D. N., Roberts, S., Proctor, M. R., Turkenburg, J. P., Dodson, E. J., Martinez-Fleites, C., ... Gilbert, H. J. (2007). The crystal structure of two macrolide glycosyltransferases provides a blueprint for host cell antibiotic immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 5336–5341.
- Botella, C., Jouhet, J., & Block, M. A. (2017). Importance of phosphatidylcholine on the chloroplast surface. *Progress in Lipid Research*, 65, 12–23.
- Botté, C., Jeanneau, C., Snajdrova, L., Bestien, O., Imberty, A., Breton, C., & Maréchal, E. (2005). Molecular modeling and site-directed mutagenesis of plant chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase reveal critical residues for activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 34691–34701.
- Botté, C. Y., Deligny, M., Rocchia, A., Bonneau, A. L., Saïdani, N., Hardré, H., ... Maréchal, E. (2011). Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology*, 7, 834–842.
- Boudière, L., Botté, C. Y., Saïdani, N., Lajoie, M., Marion, J., Bréhélin, L., ... Maréchal, E. (2012). Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. *Molecular BioSystems*, 8, 2023–2035.
- Boudière, L., Michaud, M., Petroustos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., ... Maréchal,

- E. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1837*, 470–480.
- Breton, C., Fournel-Gigleux, S., & Palcic, M. M. (2012). Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology*, *22*, 540–549.
- Breton, C., & Imberty, A. (1999). Structure/function studies of glycosyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology*, *9*, 563–571.
- Breton, C., Šnajdrová, L., Jeanneau, C., Koča, J., & Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, *16*, 29–37.
- Brown, K., Vial, S., Dedi, N., Westcott, J., Scally, S., Bugg, T., ... Cheetham, G. (2013). Crystal Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* MurG: UDP-GlcNAc Substrate Complex. *Protein & Peptide Letters*, *20*, 1002–1008.
- Browse, J., Warwick, N., Somerville, C. R., & Slack, C. R. (1986). Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the “16:3” plant *Arabidopsis thaliana*. *The Biochemical Journal*, *235*, 25–31.
- Calvez, P., Bussi eres, S., Demers, E., & Salesse, C. (2009). Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie*, *91*, 718–733.
- Calvez, P., Demers, E., Boisselier, E., & Salesse, C. (2011). Analysis of the Contribution of Saturated and Polyunsaturated Phospholipid Monolayers to the Binding of Proteins. *Langmuir*, *27*, 1373–1379.
- Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, *37*, 233–238.
- Cavali er, J. F., Ransac, S., Verger, R., & Buono, G. (1999). Inhibition of human gastric and pancreatic lipases by chiral alkylphosphonates. A kinetic study with 1,2-didecanoyl-sn-glycerol monolayer. *Chemistry and Physics of Lipids*, *100*, 3–31.
- Chang, A., Singh, S., Helmich, K. E., Goff, R. D., Bingman, C. A., Thorson, J. S., & Phillips, G. N. (2011). Complete set of glycosyltransferase structures in the calicheamicin biosynthetic pathway reveals the origin of regiospecificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*, 17649–17654.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., & Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, *328*, 307–317.
- Cov es, J., Joyard, J., & Douce, R. (1988). Lipid requirement and kinetic studies of solubilized UDP-galactose:diacylglycerol galactosyltransferase activity from spinach chloroplast

- envelope membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*, 4966–4970.
- Demé, B., Cataye, C., Block, M. A., Maréchal, E., & Jouhet, J. (2014). Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB Journal*, *28*, 3373–3383.
- Derde, M., Nau, F., Guérin-Dubiard, C., Lechevalier, V., Paboeuf, G., Jan, S., ... Vié, V. (2015). Native and dry-heated lysozyme interactions with membrane lipid monolayers: Lipid packing modifications of a phospholipid mixture, model of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*, 1065–1073.
- Distefano, A. M., Valinas, M. A., Scuffi, D., Lamattina, L., Ten, Have, A., Garcia-Mata, C., & Laxalt, A. M. (2015). Phospholipase D delta knock-out mutants are tolerant to severe drought stress. *Plant Signal Behav*, *10*, e1089371 1-7.
- Dormann, P. (1995). Isolation and Characterization of an Arabidopsis Mutant Deficient in the Thylakoid Lipid Digalactosyl Diacylglycerol. *The Plant Cell Online*, *7*, 1801–1810.
- Dörmann, P., & Benning, C. (2002). Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science*, *7*, 112–118.
- Dubots, E., Audry, M., Yamaryo, Y., Bastien, O., Ohta, H., Breton, C., ... Block, M. A. (2010). Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 6003–6011.
- Dubots, E., Botté, C., Boudière, L., Yamaryo-Botté, Y., Jouhet, J., Maréchal, E., & Block, M. A. (2011). Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie*, *94*, 86–93.
- Essigmann, B., Güler, S., Narang, R. A., Linke, D., & Benning, C. (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*, 1950–1955.
- Fischer, K., & Weber, A. (2002). Transport of carbon in non-green plastids. *Trends in Plant Science*, *7*, 345–351.
- Freeman Allen, C., Good, P., Davis, H. F., & Fowler, S. D. (1964). Plant and chloroplast lipids I. Separation and composition of major spinach lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *15*, 424–430.
- Frentzen, M. (1990). Comparison of certain properties of membrane bound and solubilized

- acyltransferase activities of plant microsomes. *Plant Science*, *69*, 39–48.
- Frentzen, M. (2004). Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: Anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*, 270–276.
- Frentzen, M., Heinz, E., Mckee, T. A., & Stumpf, P. K. (1983). Specificities and Selectivities of Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase and Monoacylglycerol-3-Phosphate Acyltransferase from Pea and Spinach Chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, *129*, 629–636.
- Fromme, P., & Grotjohann, I. (2008). Structure of photosystems I and II. *Results and Problems in Cell Differentiation*, *45*, 33–72.
- Fujii, S., Kobayashi, K., Nakamura, Y., & Wada, H. (2014). Inducible Knockdown of MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE 1 Reveals Roles of Galactolipids in Organelle Differentiation in Arabidopsis Cotyledons. *Plant Physiology*, *166*, 1436–1449.
- Galvan-Ampudia, C. S., & Testerink, C. (2011). Salt stress signals shape the plant root. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*, 296–302.
- Gounaris, K., & Barber, J. (1983). Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in Nature. *Trends in Biochemical Sciences*, *8*, 378–381.
- Gounaris, K., Barber, J., & Harwood, J. L. (1986). The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *The Biochemical Journal*, *237*, 313–326.
- Gounaris, K., Whitford, D., & Barber, J. (1983). The effect of thylakoid lipids on an oxygen-evolving Photosystem II preparation. *FEBS Letters*, *163*, 230–234.
- Graham Shipley, G., Green, J. P., & Nichols, B. W. (1973). The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *BBA - Biomembranes*, *311*, 531–544.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., & Saenger, W. (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Structural and Molecular Biology*, *16*, 334–342.
- Ha, S., Walker, D., Shi, Y., & Walker, S. (2000). The 1.9 Å crystal structure of Escherichia coli MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Science*, *9*, 1045–1052.
- Hankamer, B., Barber, J., & Boekema, E. J. (1997). Structure and Membrane Organization of Photosystem II in Green Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*.
- Härtel, H., Dormann, P., & Benning, C. (2000). DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in Arabidopsis. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10649–10654.
- Härtel, H., Essigmann, B., Lokstein, H., Hoffmann-Benning, S., Peters-Kottig, M., & Benning, C. (1998). The phospholipid-deficient *pho1* mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1415, 205–218.
- Härtel, H., Lokstein, H., Dörmann, P., Grimm, B., & Benning, C. (1997). Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 115, 1175–84.
- Härtel, H., Lokstein, H., Dörmann, P., Trethewey, R. N., & Benning, C. (1998). Photosynthetic light utilization and xanthophyll cycle activity in the galactolipid deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 407–417.
- Heinz, E. (1977). Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. In *Lipids and lipid polymers in higher plants*. – Springer Berlin Heidelberg (pp. 102–120).
- Holz, G., Witt, S., Gaude, N., Melzer, M., Schottler, M. A., & Dormann, P. (2009). The Role of Diglycosyl Lipids in Photosynthesis and Membrane Lipid Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 150, 1147–1159.
- Hu, Y., Chen, L., Ha, S., Gross, B., Falcone, B., Walker, D., ... Walker, S. (2003). Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 845–849.
- Ivanov, A. G., Hendrickson, L., Krol, M., Selstam, E., Öquist, G., Hurry, V., & Huner, N. P. A. (2006). Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in *Arabidopsis thaliana* due to photosystem I acceptor-side limitations. *Plant and Cell Physiology*, 47, 1146–1157.
- Jarvis, P., Dormann, P., Peto, C. A., Lutes, J., Benning, C., & Chory, J. (2000). Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 8175–8179.
- Jones, M. R. (2007). Lipids in photosynthetic reaction centres: Structural roles and functional holes. *Progress in Lipid Research*, 46, 56–87.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., & Krauß, N. (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411, 909–917.
- Jouhet, J. (2013). Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–5.

- Jouhet, J., Lupette, J., Clerc, O., Magneschi, L., Bedhomme, M., Collin, S., ... 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*, 1–21.
- Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J., & Block, M. A. (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *Journal of Cell Biology*, *167*, 863–874.
- Joyard, J., & Douce, R. (1977). Site of Synthesis of Phosphatidic. *Biochimica et Biophysica Acta*, *486*, 4793–4796.
- Joyard, J., & Douce, R. (1979). Characterization of phosphatidate phosphohydrolase activity associated with chloroplast envelope membranes. *FEBS Letters*, *102*, 147–150.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., & Rolland, N. (2010). Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, *49*, 128–158.
- Joyard, J., Teyssier, E., Miège, C., Berny-Seigneurin, D., Maréchal, E., Block, M. A., ... Douce, R. (1998). The Biochemical Machinery of Plastid Envelope Membranes. *Plant Physiology*, *118*, 715–723.
- Kansy, M., Wilhelm, C., & Goss, R. (2014). Influence of thylakoid membrane lipids on the structure and function of the plant photosystem II core complex. *Planta*, *240*, 781–796.
- Kelly, A. A., Froehlich, J. E., & Dörmann, P. (2003). Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes. *Society*, *15*, 2694–2706.
- Kelly, A. A., Kalisch, B., Hölzl, G., Schulze, S., Thiele, J., Melzer, M., ... Dörmann, P. (2016). Synthesis and transfer of galactolipids in the chloroplast envelope membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*, 10714–10719.
- Kern, J., & Guskov, A. (2011). Lipids in photosystem II: Multifunctional cofactors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *104*, 19–34.
- Kobayashi, K. (2016). Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *Journal of Plant Research*, *129*, 565–580.
- Kobayashi, K., Awai, K., Nakamura, M., Nagatani, A., Masuda, T., & Ohta, H. (2009). Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant Journal*, *57*, 322–331.

- Kobayashi, K., Awai, K., Takamiya, K., & Ohta, H. (2004). Arabidopsis Type B Monogalactosyldiacylglycerol Synthase Genes Are Expressed during Pollen Tube Growth and Induced by Phosphate Starvation 1. *Plant Physiology*, *134*, 1–9.
- Kobayashi, K., Endo, K., & Wada, H. (2017). Specific Distribution of Phosphatidylglycerol to Photosystem Complexes in the Thylakoid Membrane. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1–7.
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., & Ohta, H. (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*, 17216–17221.
- Kobayashi, K., Nakamura, Y., & Ohta, H. (2009). Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *47*, 518–525.
- Kobayashi, K., Narise, T., Sonoike, K., Hashimoto, H., Sato, N., Kondo, M., ... Ohta, H. (2013). Role of galactolipid biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant Journal*, *73*, 250–261.
- Koo, A. J. K., Ohlrogge, J. B., & Pollard, M. (2004). On the Export of Fatty Acids from the Chloroplast. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 16101–16110.
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., & Withers, S. G. (2008). Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, *77*, 521–555.
- Lee, A. G. (2000). Membrane lipids: It's only a phase. *Current Biology*, *10*, 377–380.
- Leloir, L. F. (1964). Nucleoside diphosphate sugars and saccharide synthesis. The fourth Hopkins Memorial Lecture. *Biochemical Journal*, *91*, 1–8.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., ... Nishida, J. (2013). Acyl-Lipid Metabolism. *The Arabidopsis Book*, *11*, e0161.
- Li, C., Wang, Y., Liu, L., Hu, Y., Zhang, F., Mergen, S., ... Chu, C. (2011). A rice plastidial Nucleotide sugar epimerase is involved in Galactolipid biosynthesis and improves photosynthetic efficiency. *PLoS Genetics*, *7*, e1002196 1-12.
- Li, M., Hong, Y., & Wang, X. (2009). Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1791*, 927–935.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., ... Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, *428*, 287–292.

- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., & Biesiadka, J. (2005). Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 resolution structure of photosystem II. *Nature*, *438*, 1040–1044.
- Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2012). OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Research*, *40*, 370–376.
- Malherbe, A., Block, M. A., Joyard, J., & Douce, R. (1992). Feedback inhibition of phosphatidate phosphatase from spinach chloroplast envelope membranes by diacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, *267*, 23546–23553.
- Maréchal, E., & Bastien, O. (2014). Modeling of regulatory loops controlling galactolipid biosynthesis in the inner envelope membrane of chloroplasts. *Journal of Theoretical Biology*, *361*, 1–13.
- Maréchal, E., Miège, C., Block, M. A., Douce, R., & Joyard, J. (1995). The Catalytic Site of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*, 5714–5722.
- Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., & De Vries, A. H. (2007). The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, *111*, 7812–7824.
- Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, *1286*, 183–223.
- McFadden, G. I. (2001). Primary and secondary endosymbiosus and the origin of plastids. *Journal Phycological*, *37*, 951–959.
- McLoughlin, F., & Testerink, C. (2013). Phosphatidic acid, a versatile water-stress signal in roots. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 1–8.
- Miège, C., Maréchal, E., Shimojima, M., Awai, K., Block, M. A., Ohta, H., ... Joyard, J. (1999). Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *European Journal of Biochemistry*, *265*, 990–1001.
- Mizusawa, N., & Wada, H. (2012). The role of lipids in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1817*, 194–208.
- Moellering, E. R., & Benning, C. (2011). Galactoglycerolipid metabolism under stress: A time for remodeling. *Trends in Plant Science*, *16*, 98–107.
- Nasir, M. N., Lins, L., Crowet, J. M., Ongena, M., Dorey, S., Dhondt-Cordelier, S., ... Deleu, M. (2017). Differential Interaction of Synthetic Glycolipids with Biomimetic Plasma

- Membrane Lipids Correlates with the Plant Biological Response. *Langmuir*, *33*, 9979–9987.
- Nelissen, B., Van de Peer, Y., Wilmotte, A., & De Wachter, R. (1995). An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolution-ary trees based on complete 16S rRNA sequences. *Early Origin of Plastids*, *12*, 1166–1173.
- Ohlrogge, J., & Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*, *7*, 957–70.
- Osteryoung, K. W., & Vierling, E. (1995). Conserved cell and organelle division. *Nature*, *376*, 473–474.
- Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L. J., Bastien, O., Rébeillé, F., ... Maréchal, E. (2014). Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways - From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research*, *54*, 68–85.
- Pitcher, W. H., Keller, S. L., & Huestis, W. H. (2002). Interaction of nominally soluble proteins with phospholipid monolayers at the air-water interface. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1564*, 107–113.
- Pribil, M., Labs, M., & Leister, D. (2014). Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *Journal of Experimental Botany*, *65*, 1955–1972.
- Qi, Y., Ingólfsson, H. I., Cheng, X., Lee, J., Marrink, S. J., & Im, W. (2015). CHARMM-GUI Martini Maker for Coarse-Grained Simulations with the Martini Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*, 4486–4494.
- Raghothama, K. G., & Karthikeyan, A. S. (1999). Phosphate acquisition. *Plant and Soil*, *274*, 37–49.
- Rawsthorne, S. (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*, *41*, 182–196.
- Reifarth, F., Christen, G., Seeliger, A. G., Dörmann, P., Benning, C., & Renger, G. (1997). Modification of the water oxidizing complex in leaves of the *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *Biochemistry*, *36*, 11769–11776.
- Rocha, J., Audry, M., Pesce, G., Chazalet, V., Block, M. A., Maréchal, E., & Breton, C. (2013). Revisiting the expression and purification of MGD1, the major galactolipid synthase in *Arabidopsis* to establish a novel standard for biochemical and structural studies. *Biochimie*, *95*, 700–708.
- Rocha, J., Nitenberg, M., Girard-Egrot, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Block, M. A., & Breton, C. (2018). Do Galactolipid Synthases Play a Key Role in the Biogenesis of Chloroplast

- Membranes of Higher Plants? *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1–7.
- Rocha, J., Sarkis, J., Thomas, A., Pitou, L., Radzimanowski, J., Audry, M., ... Breton, C. (2016). Structural insights and membrane binding properties of MGD1, the major galactolipid synthase in plants. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *85*, 622–633.
- Roughan, P. G., Holland, R., & Slack, C. R. (1980). The role of chloroplasts and microsomal fractions in polar-lipid synthesis from [1-14C]acetate by cell-free preparations from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *The Biochemical Journal*, *188*, 17–24.
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, *5*, 725–738.
- Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H., & Sato, N. (2007). Digalactosyldiacylglycerol Is Required for Stabilization of the Oxygen-Evolving Complex in Photosystem II. *Plant Physiology*, *145*, 1361–1370.
- Sakurai, I., Shen, J. R., Leng, J., Ohashi, S., Kobayashi, M., & Wada, H. (2006). Lipids in oxygen-evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants. *Journal of Biochemistry*, *140*, 201–209.
- Sarkis, J., Hubert, J. F., Legrand, B., Robert, E., Chéron, A., Jardin, J., ... Vié, V. (2011). Spectrin-like Repeats 11-15 of Human Dystrophin Show Adaptations to a Lipidic Environment. *Journal of Biological Chemistry*, *286*, 30481–30491.
- Sarkis, J., Rocha, J., Maniti, O., Jouhet, J., Vié, V., Block, M. A., ... Girard-Egrot, A. (2014). The influence of lipids on MGD1 membrane binding highlights novel mechanisms for galactolipid biosynthesis regulation in chloroplasts. *FASEB Journal*, *28*, 3114–3123.
- Sato, N., & Awai, K. (2017). “ Prokaryotic Pathway ” Is Not Prokaryotic : Noncyanobacterial Origin of the Chloroplast Lipid Biosynthetic Pathway Revealed by Comprehensive Phylogenomic Analysis. *Genome Biol. Evol.*, *9*, 3162–3178.
- Seiwert, D., Witt, H., Ritz, S., Janshoff, A., & Paulsen, H. (2018). The Nonbilayer Lipid MGDG and the Major Light-Harvesting Complex (LHCII) Promote Membrane Stacking in Supported Lipid Bilayers. *Biochemistry*, *57*, 2278–2288.
- Sekiguchi, Y., Yamada, T., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., & Kamagata, Y. (2003). *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain bacteria at the subphylum level. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *53*(6), 1843–1851.
- Siebertz, H. P., Heinz, E., Linscheid, M., Joyard, J., & Douce, R. (1979). Characterization of lipids

- from chloroplast envelopes. *Eur.J.Biochem*, *101*, 429–438.
- Singer, S. D., Chen, G., Mietkiewska, E., Tomasi, P., Jayawardhane, K., Dyer, J. M., & Weselake, R. J. (2016). Arabidopsis GPAT9 contributes to synthesis of intracellular glycerolipids but not surface lipids. *Journal of Experimental Botany*, *67*, 4627–4638.
- Slabas, A. R., & Fawcett, T. (1992). The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, *19*, 169–191.
- Standfuss, J., Van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M., & Kühlbrandt, W. (2005). Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO Journal*, *24*, 919–928.
- Testerink, C., & Munnik, T. (2005). Phosphatidic acid: A multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science*, *10*, 368–375.
- Tong, L. (2013). Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*, 863–891.
- Umena, Y., Kawakami, K., R., S. J., & Kamiya, N. (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, *473*, 55–60.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *Journal of Computational Chemistry*, *26*, 1701–1718.
- Vieler, A., Scheidt, H. A., Schmidt, P., Montag, C., Nowoisky, J. F., Lohr, M., ... Goss, R. (2008). The influence of phase transitions in phosphatidylethanolamine models on the activity of violaxanthin de-epoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1778*, 1027–1034.
- Vojta, L., Soll, J., & Bölter, B. (2007). Protein transport in chloroplasts - Targeting to the intermembrane space. *FEBS Journal*, *274*, 5043–5054.
- Wada, H., & Murata, N. (2007). The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, *92*, 205–215.
- Wakil, S. J. J., Stoops, J. K. K., & Joshi, V. C. C. (1983). Fatty acid synthesis and its regulation. *Annual Review of Biochemistry*, *52*, 537–79.
- Wakil, S. J., Titchener, E. B., & Gibson, D. M. (1958). Evidence for the participation of biotin in the enzymic synthesis of fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, *29*, 225–226.
- Wang, Z., Anderson, N. S., & Benning, C. (2013). The phosphatidic acid binding site of the arabidopsis trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, *288*, 4763–4771.
- Wang, Z., Xu, C., & Benning, C. (2012). TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast

- lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant Journal*, *70*, 614–623.
- Webb, M. S., & Green, B. R. (1991). Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1060*, 133–158.
- Wolfe, G. R., Cunningham, F. X., Durnford, D., Green, B. R., & Gantt, E. (1994). Evidence for a common origin of chloroplasts with light-harvesting complexes of different pigmentation. *Nature Chemistry*, *3676*, 630–634.
- Xu, C. (2005). Mutation of the TGD1 Chloroplast Envelope Protein Affects Phosphatidate Metabolism in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, *17*, 3094–3110.
- Xu, C., Moellering, E. R., Muthan, B., Fan, J., & Benning, C. (2010). Lipid transport mediated by arabidopsis TGD proteins is unidirectional from the endoplasmic reticulum to the plastid. *Plant and Cell Physiology*, *51*, 1019–1028.
- Xu, C., Yu, B., Cornish, A. J., Froehlich, J. E., & Benning, C. (2006). Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of Arabidopsis mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Plant Journal*, *47*, 296–309.
- Yokoi, S., Higashi, S. I., Kishitani, S., Murata, N., & Toriyama, K. (1998). Introduction of the cDNA for Arabidopsis glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. *Molecular Breeding*, *4*, 269–275.
- Yu, B., Wakao, S., Fan, J., & Benning, C. (2004). Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, *45*, 503–510.
- Yuzawa, Y., Nishihara, H., Haraguchi, T., Masuda, S., Shimojima, M., Shimoyama, A., ... Ohta, H. (2012). Phylogeny of galactolipid synthase homologs together with their enzymatic analyses revealed a possible origin and divergence time for photosynthetic membrane biogenesis. *DNA Research*, *19*, 91–102.

RÉSUMÉ

Les membranes des chloroplastes sont riches en monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et digalactosyldiacylglycérol (DGDG), deux galactolipides essentiels pour la biogenèse de ces organites et le fonctionnement de la machinerie photosynthétique. MGD1 est la galactolipide synthase majeure chez *Arabidopsis thaliana*. C'est une protéine monotopique, localisée dans l'enveloppe interne des membranes des chloroplastes, qui transfère un résidu galactose à partir d'UDP-galactose sur le diacylglycérol (DAG) pour former le MGDG. MGD1 a besoin de lipides anioniques tels que le phosphatidylglycérol (PG) pour être active, mais le mécanisme d'activation reste à ce jour inconnu. Des études antérieures ont permis d'identifier le résidu P189 comme étant potentiellement impliqué dans la liaison au PG, et le résidu H155 comme base catalytique potentielle. Le but de ma thèse a été d'obtenir plus d'informations sur le mécanisme de régulation de la MGD1, enzyme clé de la biogenèse des chloroplastes. Mon étude s'est portée sur la protéine native MGD1 et deux de ses mutants, H155A et P189A. Ces protéines ont été exprimées chez *Escherichia coli* et purifiées jusqu'à homogénéité. Une nouvelle méthode de dosage de l'activité MGDG synthase, adaptée de la technique de bioluminescence UDP-Glo™ de Promega, a été mise au point. Cette méthode présente de nombreux avantages en termes de rapidité et de sensibilité comparée à la technique classiquement utilisée qui nécessite l'utilisation d'un UDP-Galactose radiomarqué. L'étude des propriétés d'association de MGD1 et des mutants à des membranes modèles, à l'aide de la technique des monocouches de Langmuir, a permis de proposer un mécanisme réactionnel inédit, impliquant une dyade catalytique de type PG-His, qui permet d'expliquer le rôle d'activateur du PG. Un nouveau test d'activité, basé sur cette même technique de Langmuir, qui présente l'avantage de pouvoir discriminer la capacité de liaison de MGD1 à la membrane et sa capacité à transférer un galactose sur son accepteur DAG a été mis en place. Il s'agit du premier exemple de synthèse d'un galactolipide sur une membrane biomimétique constituée d'un mélange DAG-PG.

SUMMARY

The membranes of chloroplasts are enriched in monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), two essential galactolipids to the biogenesis of these organelles and the functioning of photosynthetic machinery. MGD1 is the major galactolipid synthase in *Arabidopsis thaliana*. It is a monotopic protein, located in the inner envelope of chloroplast membranes, which transfers a galactosyl residue from UDP-galactose to diacylglycerol (DAG) to form MGDG. MGD1 needs anionic lipids such as phosphatidylglycerol (PG) to be active, but the activation mechanism is still unknown. Previous studies identified the P189 residue as potentially involved in PG binding, and H155 as the putative catalytic base. The aim of my thesis was to progress in our understanding of the regulation of MGD1 activity, a key enzyme in the biogenesis of chloroplasts. My study focused on the native protein MGD1 and two mutants, H155A and P189A. These proteins were expressed in *Escherichia coli* and purified to homogeneity. A new method for assaying MGDG synthase activity, adapted from the Promega UDP-Glo™ bioluminescent technique has been developed. This method has many advantages in terms of speed and sensitivity compared to the conventionally used technique which requires the use of a radiolabeled UDP-Galactose. Furthermore, the study of the association properties of MGD1 and mutants with model membranes, using the Langmuir monolayer technique, led us to propose a novel reaction mechanism, involving a PG-His type catalytic dyad, which may explain the role of PG as activator. A new activity test, based on the Langmuir technique, which has the advantage to discriminate the MGD1 binding capacity to the membrane and its ability to transfer a galactose to its acceptor DAG has been set up. This is the first example of galactolipid synthesis on a biomimetic membrane formed of a DAG-PG mixture.