



HAL
open science

Signatures métabolomiques et transcriptomiques de l'immunité antivirale chez *Ostreococcus mediterraneus*

Rémy Marcellin-Gros

► **To cite this version:**

Rémy Marcellin-Gros. Signatures métabolomiques et transcriptomiques de l'immunité antivirale chez *Ostreococcus mediterraneus*. Biologie moléculaire. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS131 . tel-03476474

HAL Id: tel-03476474

<https://theses.hal.science/tel-03476474>

Submitted on 13 Dec 2021

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.

Sorbonne Université

École doctorale 227 – Sciences de la Nature et de l’Homme : Écologie et Évolution

Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer

Laboratoire de Biologie Intégrative des Organismes Marins (UMR7232)

Équipe Génomique Évolutive et Environnementale du Phytoplancton

Signatures métabolomiques et transcriptomiques de l’immunité antivirale chez *Ostreococcus mediterraneus*

Par Rémy Marcellin-Gros

Thèse de doctorat de Biologie

Présentée et soutenue publiquement le 11 Décembre 2020

Devant un jury composé de :

Jouhet Juliette	DR CNRS – LPCV CEA Grenoble	Examinatrice
Li-Beisson Yonghua	DR CNRS – BIAM CEA Cadarache	Rapporteuse
Michel Sylvie	Pr. Université Paris Descartes – COMETE	Rapporteuse
Piganeau Gwenaël	DR CNRS – BIOM	Directrice de thèse
Stien Didier	DR CNRS – LBBM	Directeur de thèse
Suzuki Marcelino	Pr. Sorbonne Université	Examinateur
Toulza Eve	MCF Université de Perpignan – IHPE	Examinatrice
Wolfender Jean-Luc	Pr. Université de Genève – PBNP	Examinateur



A mes parents,

et Amandine

REMERCIEMENTS

Les remerciements sont généralement les dernières lignes que l'on écrit. Ce sont aussi les plus dures car ce sont les plus personnelles et les plus attendues de toutes ! Mais c'est avec beaucoup de bonheur et de soulagement que je peux maintenant exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont accompagné et soutenu au cours de ces trois années et pour certaines depuis bien plus longtemps.

Je tiens en premier lieu à remercier mes superviseurs Gwenaël Piganeau et Didier Stien qui m'ont fait confiance, m'ont guidé et aidé tout au long de cette aventure qu'est la thèse. Ils m'ont ouvert les portes et m'ont permis de me propulser dans l'univers passionnant de la recherche. Je leur en suis très reconnaissant.

Je souhaite également remercier les membres du jury de thèse d'avoir accepté avec enthousiasme d'évaluer mon travail, Juliette Jouhet, Yonghua Li-Beisson, Sylvie Michel, Eve Toulza et Jean-Luc Wolfender.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe Génophy qui m'a accueilli, entouré et s'est placé en soutien indéfectible. Merci Nigel et Hervé pour votre passion et votre bienveillance. Je veux également remercier Gilles Mirambeau pour les discussions captivantes que nous avons eu sur les virus, ses idées précieuses et le dynamisme qu'il a su m'insuffler en fin de thèse. Merci Sheree pour ta gentillesse, ton travail sur l'immunité a été un véritable exemple et une source d'inspiration. Merci Fred pour ton aide précieuse à la paillasse et surtout pour ta bonne humeur et ton goût pour la bonne musique. Vient maintenant le moment de remercier mes partenaires de bureau. Les personnes avec qui j'ai partagé le plus de temps durant ces trois ans. Merci Mathilde pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta positivité à toute épreuve. Merci Felipe pour nous avoir communiqué ta passion pour l'univers si nébuleux des protistes et pour ton âme de poète. Un grand merci à toi Laurie, ce fût une épopée exceptionnelle en ta présence ! Ton intelligence, ta spontanéité, ton entièreté et surtout ta résistance à toute épreuve m'ont beaucoup inspirés et encouragés ! Je n'ai que de bons souvenirs. Merci Julie pour ta présence et ton soutien bienveillant en cette fin de thèse. C'était vraiment un plaisir de finir ma thèse avec une collègue aussi géniale ! Je te souhaite plein de courage et de réussite pour la suite ! Merci Marc, on se sera à chaque fois croisé, mais on aurait passé d'excellents moments je n'en doute pas. Enfin, merci à Adrien, Manon, Paul, Sophie, Camille d'avoir apporté votre bonne humeur dans l'équipe.

Je souhaite remercier Florence Piola, qui a eu un rôle déterminant en m'initiant à l'univers de la recherche et en m'ouvrant pour la première fois les portes de son laboratoire.

J'aimerais remercier toutes les personnes qui sont devenues mes amis à l'Observatoire qui ont toutes contribué à faire de ces trois années une période exceptionnelle. Malgré les épreuves que représentent une thèse vous avez constitué un environnement où j'ai pu passer les meilleurs moments. Merci pour toutes les fêtes, les sorties, le sport, les randonnées, les parties de volley sur la plage, de ping-pong, les pique-niques, les karaokés, les repas, tous les anniversaires, les vacances à la montagne, au ski, à la campagne, les soirées à la coloc', aux 9caves, à la vieille cave et dans toutes les caves de Banyuls. Je vais sans doute oublier du monde mais merci Clément, Mattéa, Rafath (pour la danse du condor), Maxence, Kévin (en plus d'être un voisin formidable !) et Justina, Lydvina, Lyvia, Lucas, Nina (c'est un peu grâce à toi que je suis là !), Evane, Fanny, Mathilde, Antoine, Julie, Grégoire, Paul, Valentin, Charlène, Pavla (merci pour Dabbei), Leïla, Stéfan, Ingrid, Marion, Rachid, Gaëlle (pour le yoga qui m'a aidé à rester zen), Léo... Merci pour tout !

Je voudrais remercier mes amis de Lyon avec qui une partie de cette aventure à commencé et qui sont toujours là ! Merci Nina, Thomas (pour les fous rires), Hélène, Bertrand (pour les farfalles), Lucas et Nico. Vous êtes au top !

Merci Antoine d'être un ami proche et sincère, pour toutes nos sorties nocturnes festives, déguisées ou champêtres pour aller herboriser ou chercher des gammars. A très vite !

Je voudrais te remercier vraiment très fort Pauline car tu as toujours été à mes côtés. Tu as contribué à la réussite de ce projet par ton soutien permanent, ta perspicacité, ton enthousiasme et ta douceur. Tu as su me faire m'évader de la thèse lorsque c'était nécessaire. Je garde en mémoire tous ces moments magnifiques, plein de surprises. Je te remercie pour tous ces souvenirs et ceux qui viendront.

Merci enfin à mes parents, qui sont un modèle par leur persévérance et leur raffinement dans le travail et tout ce qu'ils entreprennent. Merci d'être des esprits libres et curieux, prêts à relever tous les défis. Merci Papa pour ta culture, ton éclectisme et ton enthousiasme. Je pense que ce sont des qualités qui m'ont inspiré. Merci Amandine d'être une grande sœur aussi attentionnée et géniale ! Ton humour et ton intelligence m'ont beaucoup aidé à me construire. Merci pour votre soutien et votre amour.

« Je cherche quelque chose de plus mystérieux encore. C'est ce passage dont il est question dans les livres, l'ancien chemin obstrué, celui dont le prince harassé de fatigue n'a pu trouver l'entrée. Cela se découvre à l'heure la plus perdue de la matinée, quand on a depuis longtemps oublié qu'il va être onze heures, midi...Et soudain, en écartant, dans le feuillage profond, les branches, avec ce geste hésitant des mains à hauteur du visage inégalement écartées, on l'aperçoit comme une longue avenue sombre dont la sortie est un rond de lumière tout petit. »

Alain Fournier. Le Grand Meaulnes, 1913

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Chapitre I – Introduction	1
1. Présentation du système biologique phytoplancton eucaryote-virus.....	1
1.1. Le phytoplancton.....	1
1.2. Le phytoplancton eucaryote	3
1.3. Archaeplastida : émergence de la lignée verte et des premières algues vertes.....	6
1.4. Les Mamiellophyceae.....	7
1.5. Phylogénie des virus des microalgues du phytoplancton eucaryote.....	9
2. Étude des interactions microalgues-virus.....	14
2.1. Dynamique hôte-virus : la notion de phénotype immunitaire	14
2.2. Les différentes étapes de l'infection virale.....	17
2.3. Les caractéristiques génomiques de la résistance du système <i>Ostreococcus</i> -Prasinovirus.....	20
3. Approche métabolomique dans l'étude des interactions microalgues-virus	22
3.1. Méthodologie, définitions et concepts.....	22
3.2. Méthodes d'extractions, d'analyses, annotation et identification.....	24
3.3. Classification des lipides	27
3.4. Biosynthèse des sphingolipides.....	48
3.5. Biosynthèse des terpènes.....	53
3.6. Approche intégrative : la métabolomique dans l'étude du système microalgue-virus.....	58
4. Objectifs de la thèse	63
Chapitre II – Diversité métabolomique des Prasinophytes. La métabolomique comme outil de compréhension de l'histoire évolutive du phytoplancton eucaryote ?.....	67
1. Introduction	68
2. Results	69
2.1. An Untargeted Holistic Analysis of Metabolomic Profiles.....	69
2.2. Identification of the Major Metabolites and Detection of Chemotaxonomic Markers.....	70
2.3. Phylogenetic Analysis and Metabolome-Based Taxonomy	74
3. Materials and Methods	76
4. References	78

Chapitre III – Approche intégrative : du transcriptome au métabolome pour comprendre la régulation des gènes sur le métabolisme cellulaire dans le cadre de la résistance antivirale..... 85

1. Introduction	85
2. Plan expérimental	87
3. Analyse transcriptomique des profils immunitaires résistants et sensibles au virus OmV2	89
3.1. Résultats	89
3.2. Conclusion.....	100
4. Analyse métabolomique de profils résistants et sensibles au virus OmV2	100
4.1. Résultats	100
4.2. Discussion	110
5. L’approche intégrative du transcriptome au métabolome : comprendre comment se traduit la régulation des gènes sur le métabolisme cellulaire	115
5.1. Lien gène-métabolite : preuve de concept.....	117
5.2. Du métabolite à l’expression des gènes : le cas des galactolipides	119
5.3. Du métabolite à l’expression des gènes : le cas des phytostérols.....	131
5.4. Du métabolite à l’annotation fonctionnelle d’un nouveau gène : le cas des céramides ..	138
6. Conclusion.....	144
7. Matériels & Méthodes	146

Chapitre IV – Analyse métabolomique du virus OmV2 151

1. Introduction	151
2. Résultats & Discussion.....	153
3. Conclusion & Perspectives.....	158
4. Matériel & Méthodes.....	159

Chapitre V – Conclusions et perspectives de la thèse 163

Références Bibliographiques..... 175

Figures supplémentaires du Chapitre II..... 205

Figures supplémentaires du Chapitre III 219

Figures supplémentaires du Chapitre IV..... 237

RESUME

Ostreococcus mediterraneus est un phytoplancton (microalgue) picoeucaryote à la base des réseaux trophiques marins côtiers. Ce phytoplancton est soumis à des attaques virales de grands virus nucléocytoplasmiques à ADN du genre Prasinovirus dont la souche *Ostreococcus mediterraneus* Virus 2 (OmV2) fait partie. Au sein de populations de microalgues sensibles au virus il a été observé l'émergence spontanée de phénotypes immunitaires résistants. Les bases génétiques de cette résistance ont récemment été décrites chez *Ostreococcus* : elles semblent véhiculées par un chromosome immunitaire atypique appelé SOC (*Small Outlier Chromosome*). Dans ce contexte nous avons cherché à caractériser les signatures métabolomiques et transcriptomiques de cette immunité au travers d'une approche visant à corrélérer ces deux niveaux d'expression. Des métabolites lipidiques biomarqueurs (galactolipides, phytostérols, sphingolipides) de chaque profil immunitaire ainsi que les gènes associés à leur métabolisme ont été identifiés. Ces données ont été mis en perspective des résultats de l'analyse métabolomique du virus afin d'identifier des voies métaboliques sollicitées et détournées par le virus lors de l'infection.

ABSTRACT

Ostreococcus mediterraneus is a picoeukaryotic phytoplankton (microalgae) at the base of coastal marine food webs. This phytoplankton is subject to viral attacks from large nucleocytoplasmic DNA viruses of the genus Prasinovirus, of which the *Ostreococcus mediterraneus* Virus 2 (OmV2) strain is a member. Within populations of microalgae sensitive to the virus, the spontaneous emergence of resistant immune phenotypes has been observed. The genetic basis of this resistance has recently been described in *Ostreococcus*: they seem to be carried by an atypical immune chromosome called SOC (*Small Outlier Chromosome*). In this context, we sought to characterize the metabolomic and transcriptomic signatures of this immunity through an approach that aims to correlate these two levels of expression. Biomarker metabolites and genes associated with the immune profiles have been identified. These data were put into perspective with the results of the metabolomic analysis of the virus in order to identify the metabolic pathways hijacked by the virus during infection.

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AA : acide arachidonique
AAPT : aminoalcool phosphotransférase
ACCase : acétyl-CoA carboxylase
ACD5 : accelerated cell death
ACP : protéine transporteur de chaînes acyles
ACP : analyse en composante principale
AG : acide gras
ALA : acide α -linoléique
AOC : allène oxyde cyclase
AOS : allène oxyde synthétase
APCI : ionisation chimique
ARA : acide arachidonique
AS : acide sialique

B

3BETAHSDD : 3 β -hydroxystéroïde-4 α -carboxylate 3-déhydrogénase
BL : bétaine lipide
BOC : big outlier chromosome

C

CAR : récepteur à Coxsackievirus et Adenovirus
CAS : cycloartenol synthase
CCT : cholinephosphate cytidilyltransférase
CD4 : cluster de différenciation
CDI-PT : CDP-diacylglycérol-inositol 3-phosphatidyltransférase
CDP-DAG : cytidine diphosphate-diacylglycérol
CDP-ME : cytidyldiphosphate-méthylérythritol
CD-PSS : CDP-diacylglycérol:sérine *O*-phosphatidyltransférase
CDS : cytidine diphosphate-diacylglycérol synthase
CK : choline kinase
CMK : CDP-ME kinase
CMS : MEP cytidilyltransférase
CoA: coenzyme A
CPI : cycloeucaleenol cycloisomérase
CS : ceramide synthase
CTP : cytidine triphosphate
CYP450 : cytochrome P450
CYP51 : stérol 14 α -déméthylase
CYP710A : stérol 22-désaturase

D

DAF : decay-accelerating factor
DAG : Diacylglycérol

DES : divinyl-éther synthétase
DGAT : Diacylglycérol transférase
DGCC : diacylglycéryl carboxyhydroxyméthylcholine
DGDG : digalactosyl monoacylglycérol
DGDS : digalactosyl monoacylglycérol synthase
DGHS : diacylglycéryl homosérine
DGLA : dihomog- γ -linolenic acid
DGTA : diacylglycéryl-hydroxyméthyl-triméthyl- β -alanine
DGTS : diacylglycéryl-triméthylhomosérine
DHA : acide docosahexaénoïque
DMAPP : diméthylallyl-pyrophosphate
dnOPDA : acide dinor-oxo-phytodiénoïque
DOPC : dioleoyl phosphatidylcholine
DOXP : désoxy-xylulose-5-phosphate
DPA : acide docosapentaénoïque
DWF1 : Δ 24-sterol réductase
DWF5 : 7-déhydrocholestérol réductase
DXR : DXP réductoisomérase
DXS : DOXP synthase

E

EAS : époxy alcool synthétase
ECT : éthanolaminephosphate cytidilyltransférase
EDA : acide éicosadiénoïque
EhV : *Emiliana huxleyi* Virus
EK : éthanolamine kinase
Elo : Élongase
ENR: énoyl-ACP réductase
EPA : acide éicosapentaénoïque
ESI : ionisation par électro-spray
ETA : acide éicosatétraénoïque

F

FAT : acide gras-ACP thioestérase
FAX : acide-gras export
FK : Δ 14-stérol réductase
FPPS : farnésyl pyrophosphate synthase
FR α : folate receptor α

G

G1P : glucose-1-phosphate
G3P : glycérol-3-phosphate
GCS : glucosylcéramide synthase
GlcCER : glucosylcéramide
GLUT-1 : glucose transporteur 1
GIPC : glycosyl inositol-phosphorylcéramide
GIPC-PLD : GIPC-phospholipase D

H

HD: 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase
HDS : HMB-PP synthase
HDR : HMB-PP réductase
HPL : hydroperoxyde lyase
HR : réponse hypersensible
HSD17B7 : 3 β -hydroxystéroïde 3-déhydrogénase
HTLV-1 : human T-lymphotropic virus type I
hVLCFA : 2-hydroxylated very long chain fatty acid
HYD : cholestérol Δ -isomérase

I

Ig : immunoglobine
IPC : inositolphosphocéramide
IPP : isopentényl-pyrophosphate
IPCS : inositolphosphocéramide synthase
IPK : IP kinase
IPPI : IPP isomérase
IPUT : inositolphosphoryl-céramide glucuronosyl-transférase

J

JA : acide jasmonique
JAM : molécule d'adhésion de jonction

K

KAR: 3-kétoacyl-ACP réductase
KAS: 3-kétoacyl-ACP synthase
3-KSR : 3 β -hydroxystéroïde 3-déhydrogénase
KSR : cétophosphinganine réductase

L

LA : acide linoléique
LACS: longue chaîne acyl-CoA synthétase
LC : longue chaîne
LCB : longue chaîne de base
LN : acide linoléique
LOHI-2-3 : gènes codant pour des céramide synthase
LOX : lipoxigénase
LPA : Acide Lyso-Phosphatidique

M

MAG : Monoacylglycérol
MALDI : ionisation-désorption laser assisté par matrice
MAP-kinase : mitogen activated protein kinase
MAT : malonyl-CoA:ACP transacylase
MECCP : méthylérythritol-2,4-cyclopyrophosphate
MCS : MECCP synthase
MECR : mitochondrial énoyl-ACP réductase.

MGAT : Monoacylglycérol transférase
MGDG : monogalactosyl monoacylglycérol
MGDS : monogalactosyl monoacylglycérol synthase
MOD : matière organique dissoute
MOP : matière organique particulaire
MpV1 : *Micromonas pusilla* Virus

P

PA : acide phosphatidique
PAP : acide phosphatidique phosphatase
PC : phosphatidylcholine
PCD : programmed cell death, mort cellulaire programmée
PDAT : phospholipide:DAG acyltransférase
PDPT : phosphatidyl-*S,S*-dimethylpropanethiol
PE : phosphatidyléthanolamine
PEAMT : phosphoéthanolamine méthylatransférases
PG : phosphatidylglycerol
PGP : phosphatidyl-glycérophosphate
PGPP : phosphatidyl-glycérophosphate phosphatase
PGS : CDP-DAG:G3P phosphatidyltransferase.
PL : phospholipide
PLMT : phosphatidyléthanolamine *N*-méthyltransférases
PME : phosphatidylmonométhyléthanolamine
PI : phosphatidylinositol
PS : phosphatidylserine
PSS I : Phosphatidylsérine Synthase I
PUFA : poly unsaturated fatty acid – acide gras polyinsaturé
PXG : peroxygénase

R

RMN : résonnance magnétique nucléaire

S

SDA : acide stéaridonique
SDC : sérine décarboxylase
SFV : Semliki Forest Virus
sGSL : sialic acid viral sphingolipid – acide sialique estérifié sur un sphingolipide viral
SIN : Sindbis Virus
SMO1-2 : 4,4-diméthylstérol C-4 α -méthyl-monooxygénase
SMO2-2 : 4 α -monométhylstérol monooxygénase
SMT1 : stérol 24-C-méthyltransférase
SMT2 : 24-méthylène-stérol C-méthyltransférase
SOC : small outlier chromosome
SPT : sérine palmitoyl-CoA transférase
SQD1 : UDP-sulfoquinovose synthase
SQD2 : sulfoquinovose transférase
SQDG : sulfoquinovosyl diacylglycérol
SQM : squalène monooxygénase
SQS : squalène synthase

STE : Δ 7-stérol 5-désaturase

T

TAG : triacylglycérol

TAM : Tyro3/Axl/Mer receptor

TIM : T-cell immunoglobulin-mucin

TIR-NB-LRR : toll interleukin 1 nucleotide-binding leucine-rich repeat

TLC : Tram-Lag-CLN8

TOF : temps de vol

U

UDP : uridine diphosphate

UGP3 : UDP-glucose pyrophosphorylase

UV : ultraviolet

V

VFL : virus free lysat

VSV : Vesicular Stomatitis Virus

CHAPITRE I – INTRODUCTION

1. PRESENTATION DU SYSTEME BIOLOGIQUE PHYTOPLANCTON EUCARYOTE-VIRUS

1.1.LE PHYTOPLANCTON

Le nom de phytoplancton provient des termes grecs *phyton*, plante et *planktos*, errante. Il désigne ainsi l'ensemble des organismes photosynthétiques vivants en suspension dans l'eau (Reynolds, 2006). Ces organismes ont souvent une taille microscopique (0.4 à 200 μm) le plus souvent unicellulaire, parfois pluricellulaire. Les organismes du phytoplancton sont pour la plupart hétérotrophes vis-à-vis du carbone, certains étant aussi mixotrophes. Le phytoplancton est quasi ubiquitaire, il colonise tous les milieux en présence d'eau, de lumière, et de sels nutritifs : les eaux douces et marines, les sols, les surfaces enneigées et des environnements aquatiques aux paramètres physico-chimiques extrêmes (température, pH, salinité).

Bien que le phytoplancton marin ne représente qu'un pourcent de la biomasse à l'échelle terrestre (Bidle and Falkowski, 2004), il constitue près de la moitié de la production primaire nette annuelle de notre planète (Field, 1998). De fait, il capte 50% du dioxyde de carbone atmosphérique (Behrenfeld, 2001) et produirait 50 à 80% du dioxygène sur terre (Häder et al., 2014). Le phytoplancton marin joue ainsi un rôle fondamental dans la régulation des cycles biogéochimiques et les transferts trophiques (**Figure 1**). La dynamique des populations phytoplanctoniques est multifactorielle, elle repose sur un mécanisme de balancier entre reproduction et pertes. Les pertes des individus au sein des populations sont dues en majorité à la prédation mais aussi la mort naturelle des cellules, la disparition dans les étages inférieure des océans, la compétition entre espèces et plus largement à l'infection par des virus. Les virus seraient à l'origine de la lyse de 25 % des populations phytoplanctoniques à l'échelle globale (Brussaard, 2004). Ces fortes contraintes imposent un renouvellement régulier du phytoplancton pour balancer les pertes mais assurent un transfert trophique de matière organique vers les niveaux supérieurs absolument essentiel au fonctionnement des écosystèmes marins (Worden et al., 2004, 2015).

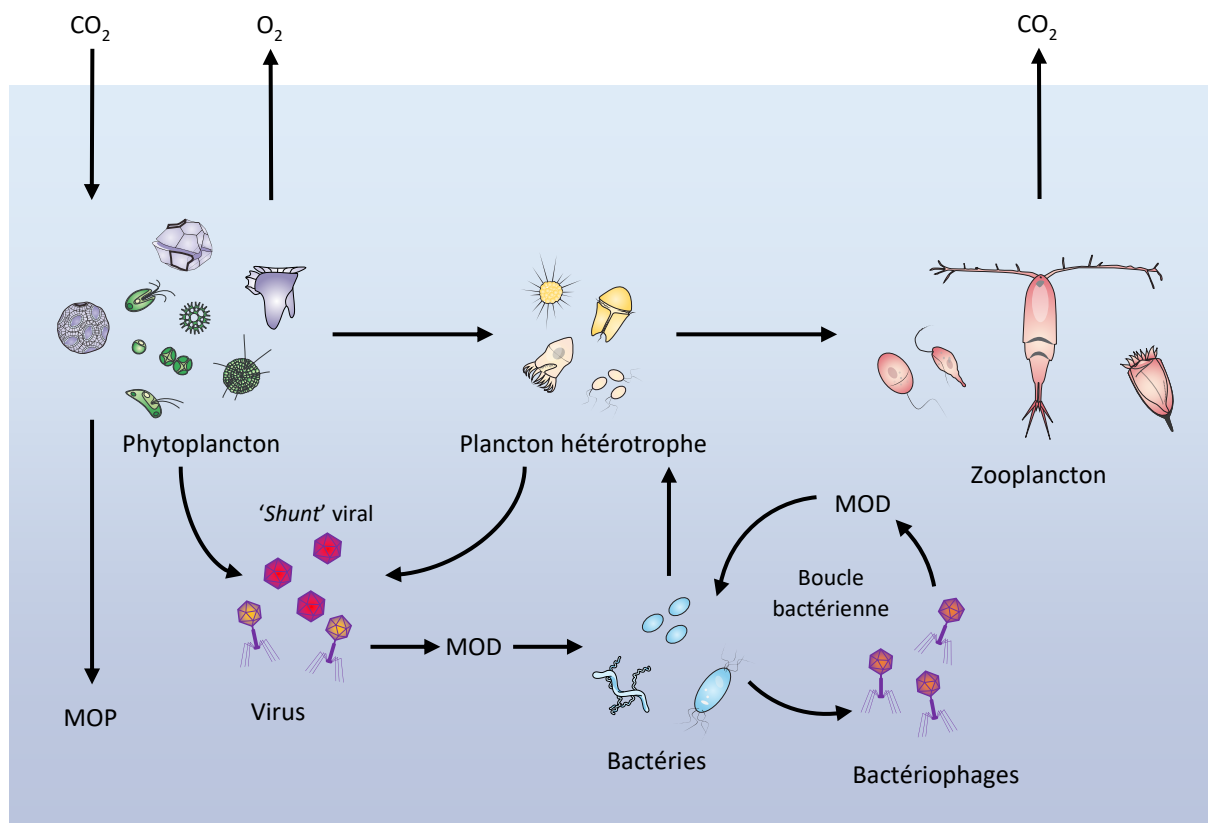


Figure 1. Schéma des relations trophiques entre les différents organismes planctoniques qui composent la zone supérieure des océans. Les flèches indiquent les transferts trophiques et de matière. La fixation du CO_2 et sa transformation en matière organique est réalisée par différents eucaryotes photosynthétiques et cyanobactéries. Le plancton hétérotrophe consomme d'autres microorganismes du plancton (eucaryotes, bactéries, archaeobactéries), y compris le phytoplancton. Les virus sont une force majeure de renouvellement des populations planctoniques, induisant un relargage de matière organique dissoute (MOD) vers les niveaux trophiques inférieurs au travers du 'shunt' viral. La boucle bactérienne impliquant les bactériophages permet le maintien de la matière organique dans les niveaux trophiques inférieurs. Les bactéries ainsi que le plancton hétérotrophe, le zooplancton et même le phytoplancton la nuit participent à la respiration et au relargage de CO_2 dans l'atmosphère (d'après Worden et al., 2015).

Le premier organisme phytoplanctonique est vraisemblablement issu d'un ancêtre anoxygénique des cyanobactéries (procaryote) qui aurait acquis la fonction de photosynthèse oxygénique il y a 3.8 milliards d'années (Buick, 2008). La photosynthèse oxygénique implique le captage du CO_2 et la photolyse de l'eau en électrons, protons et dioxygène. Le succès des organismes phytoplanctoniques a été tel qu'il a induit une oxygénation progressive de l'atmosphère terrestre et a permis l'apparition de la vie aérobie. L'oxygène étant fortement électro-négatif (accepteur d'électrons puissant), une quantité plus grande d'électrons a pu transiter au sein des chaînes de transport d'électrons ce qui a permis aux organismes aérobies

une production accrue d'énergie. Cet accroissement d'énergie disponible a rendu possible le succès écologique des espèces aérobies et généré une explosion de la production primaire, notamment dans les océans (Canfield et al., 2006; Holland, 2006). L'oxygène ayant également un fort pouvoir oxydant, il aurait induit la compartimentalisation cellulaire et l'apparition des premiers organismes eucaryotes afin de protéger les cellules et son ADN de réactions d'oxydations (Gross and Bhattacharya, 2010).

1.2. LE PHYTOPLANCTON EUCARYOTE

Si l'apparition des premiers organismes eucaryotes est estimée à -2.5 milliards d'années, l'émergence du premier eucaryote photosynthétique est plus récente. Il est le résultat d'une endosymbiose primaire survenue il y a environ 1.6 milliards d'années : un eucaryote hétérotrophe aurait englobé une cyanobactérie photosynthétique (Yoon et al., 2004). La cyanobactérie aurait été progressivement assimilée à la machinerie cellulaire de son hôte, perdant et transférant une grande partie de son génome à l'hôte pour devenir un organe spécialisé dans la photosynthèse : le chloroplaste. De cette endosymbiose primaire émergea le groupe des Archaeplastida regroupant les Glaucophyta, les Rhodophyta (algues rouges) et les Chlorophyta (Chloroplastida), dont sont issus les algues vertes et les plantes terrestres (Burki et al., 2020; Not et al., 2012) (**Figures 2 et 3**).

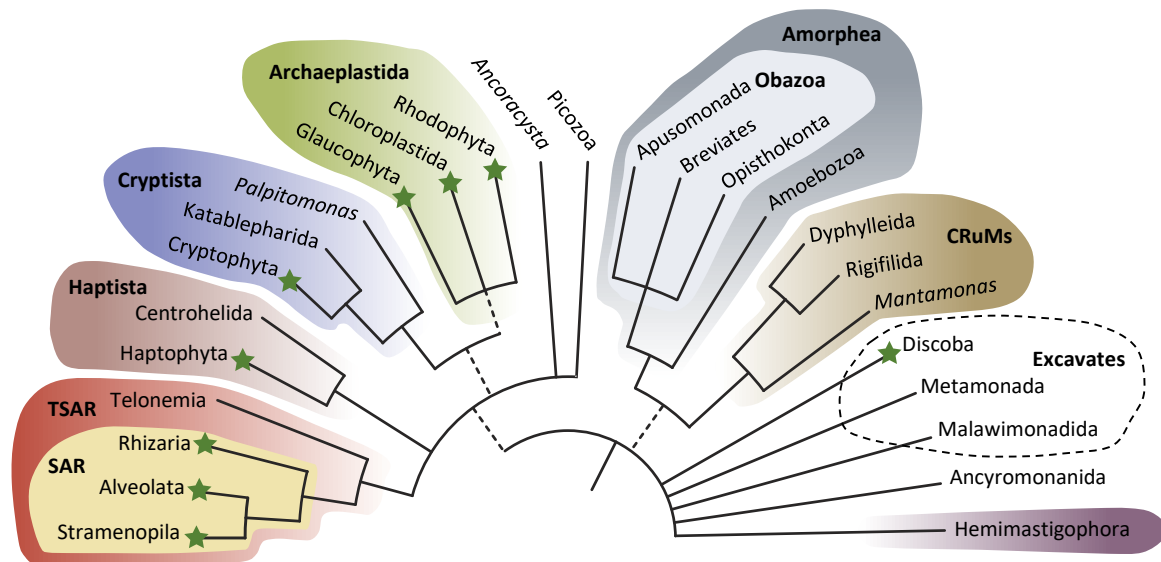


Figure 2. Arbre phylogénomique des eucaryotes, adapté d'après Burki *et al.*, 2020. Les zones colorées définissent les « supergroupes ». Les branches des ordres dont la ramification n'est pas résolue sont représentées en râteau (multifurcation). Les lignes en pointillés reflètent une incertitude quant à la monophylie des groupes. Les étoiles indiquent la présence d'organismes phytoplanctoniques.

Les chloroplastes des algues rouges et des algues vertes ont été transférés à d'autres lignées par endosymbiose secondaire. Les euglénides et les chlorarachniophytes, ainsi qu'un petit groupe de dinoflagellés (*Lepidodinium*), ont absorbé les chloroplastes d'algues vertes. Le phytoplancton des supergroupes Cryptista, Haptista et SAR provient d'une endosymbiose secondaire entre une cellule eucaryote hétérotrophe et une algue rouge. Les SAR constituent un supergroupe d'algues macroscopiques (kelp-laminaire), microscopiques uni- et multicellulaires. C'est d'ailleurs le supergroupe le plus diversifié, il contient la moitié de la diversité des eucaryotes (del Campo et al., 2014) en plus de dominer en terme d'abondance et de productivité les écosystèmes : les diatomées (*Stramenopila*) représenteraient 40 % de la production primaire des océans (Boyd and Newton, 1995). Le groupe des Alvéolata contient les ciliates et les apicomplexa : deux embranchements d'organismes hétérotrophes ayant perdu leur plaste ou la capacité de photosynthèse. Les premiers sont des unicellulaires constitués de cils vibratiles, les deuxièmes sont des parasites des métazoaires. Enfin les dinoflagellés sont un embranchement très complexe, présentant des régimes trophiques variés (hétérotrophe, mixotrophe ou autotrophe). Certains dinoflagellés sont des prédateurs du phytoplancton marin : comme *Ceratium hirundinella* envers la diatomée *Phaeodactylum tricorutum*. Les dinoflagellés sont surtout remarquables par les symbioses tertiaires qu'elles ont réalisées à de multiples reprises avec les algues de différents embranchements (algues vertes, cryptomonades, haptophytes et diatomées).

La phylogénie extrêmement diversifiée du phytoplancton est le témoin d'une histoire évolutive complexe impliquant de multiples événements d'endosymbiose, l'acquisition et la perte de fonctions au cours d'une diversification parfois poussée au sein de plusieurs groupes.

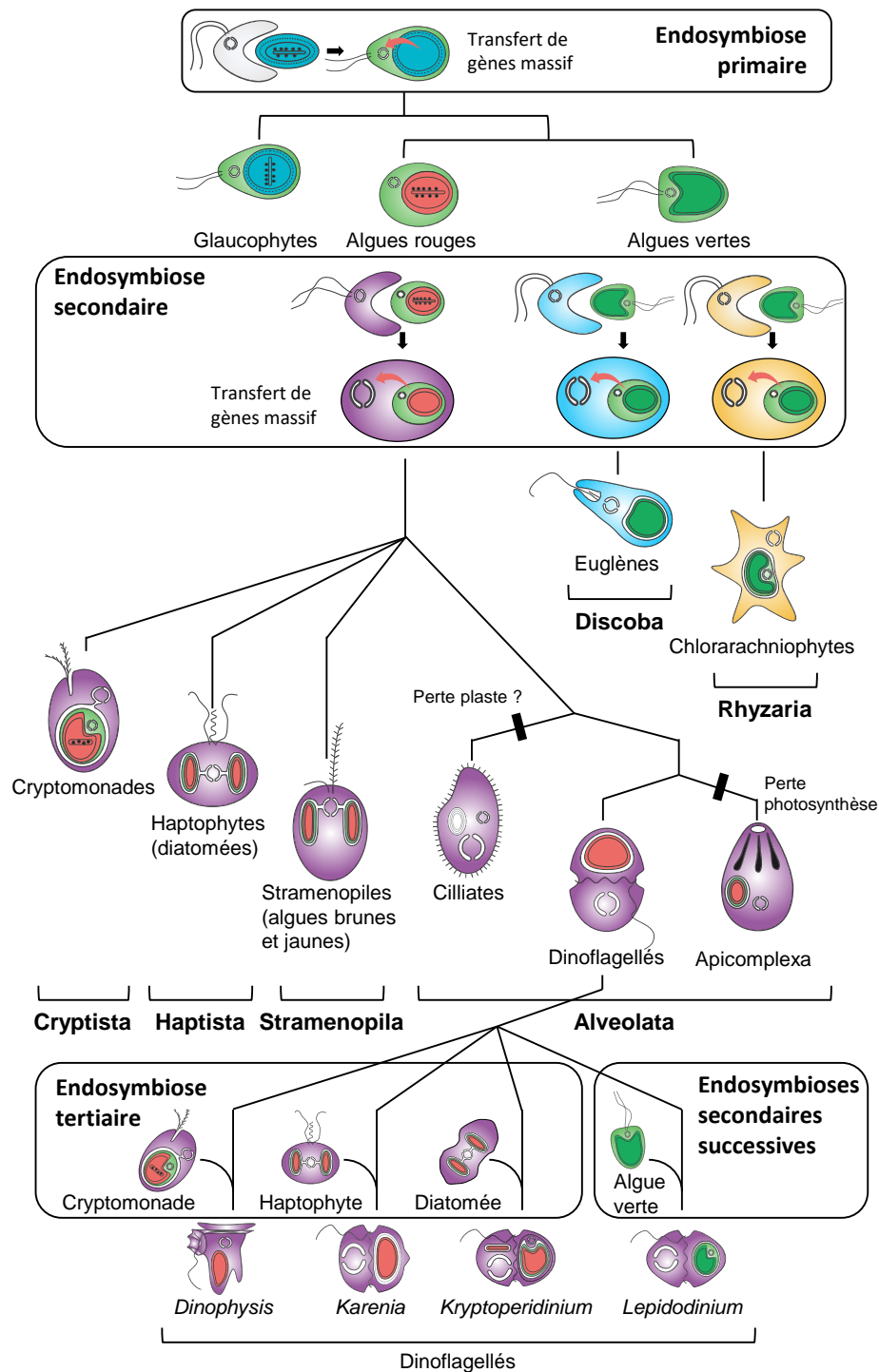


Figure 3. Schéma illustrant la théorie de l'endosymbiose du chloroplaste chez les eucaryotes. En haut du schéma figure l'évènement d'endosymbiose primordial entre une cyanobactérie et un eucaryote unicellulaire. L'endosymbiote a été réduit et intégré à son hôte, ce processus a impliqué un transfert massif de gènes vers la cellule hôte et l'acquisition de nouvelles fonctions. Les Glaucophytes, algues rouges et algues vertes sont toutes issues de cet évènement d'endosymbiose primaire. Par la suite, algues rouges et vertes furent successivement à de nouvelles cellules eucaryotes (endosymbiose secondaire). Les algues vertes ont donné naissance à deux lignées indépendamment : les Discoba et les Rhizaria.

Tandis que données moléculaires semblent confirmer l'origine endosymbiotique unique des Cryptista, Haptista, Stramenopila et Alveolata (Hampl et al., 2009). Le chloroplaste fut perdu au cours de l'évolution pour les Ciliates et les Apicomplexa. Finalement, les Dinoflagellés ont substitué leur chloroplaste plusieurs fois au cours d'évènements d'endosymbiose tertiaire avec des Cryptomonades et des Haptophytes aboutissant à des organismes avec des plastes à trois voire quatre membranes et une fois avec une algue verte au travers d'endosymbioses secondaires successives (d'après Keeling, 2010).

1.3. ARCHAEPLASTIDA : EMERGENCE DE LA LIGNÉE VERTE ET DES PREMIÈRES ALGUES

VERTES

La lignée verte (Archaeplastida) aurait émergé il y a 1.5 milliards d'années *via* l'évènement d'endosymbiose décrit précédemment. Une divergence précoce (~1 milliard d'années) au sein des Archaeplastida a donné naissance à ses deux lignées principales : les Chlorophyta et les Streptophyta, qui ont ensuite suivi des trajectoires évolutives radicalement différentes (Lewis and McCourt, 2004). Les Chlorophyta comprennent deux divisions : les « Prasinophytes » qui ne forment pas un groupe monophylétique et comportent la majorité des espèces picoeucaryotes dans les océans, et les core Chlorophytes comprenant des espèces d'eau douce et marine mais aussi des espèces terrestres (**Figure 4**) (Leliaert et al., 2011). Chez les Streptophytes on distingue également deux divisions : les Charophytes qui sont des algues d'eau douces avec quelques espèces terrestres et enfin les plantes terrestres qui constituent le groupe le plus diversifié en terme d'espèces photosynthétiques décrites à ce jour (> 400 000) (Lughadha et al., 2016).

Le manuscrit s'intéressera à quelques algues de la lignée des Chlorophytes (**Figure 4**). Au sein de la division des Prasinophytes on retrouve deux groupes basaux : les Nephroselmidophycées et les Pyramimonales. Les Nephroselmidophycées contiennent les algues du genre *Nephroselmis*, des algues unicellulaires biflagellées (asymétriques) recouvertes d'écailles non minéralisées, elles possèdent un chloroplaste unique avec pyrénôïde (structure qui concentre les enzymes de la photosynthèse) et un stigma (organite photorécepteur). Parmi les Pyramimonales on retrouve les algues du genre *Pyramimonas*. Ce sont des unicellulaires recouverts d'écailles non minéralisées possédant 4 à 8 flagelles de taille identique, un chloroplaste unique avec pyrénôïde et un stigma. Leur nom provient de leur forme pyramidale et parfois globuleuse. Les Mamiellales ont quant à elles divergées plus récemment et leurs caractéristiques sont décrites dans le paragraphe 1.4. Enfin, l'espèce *Picochlorum costavermella* de la classe des Trebouxiophycées parmi les core Chlorophytes sera également

citée dans les analyses présentées dans ce manuscrit. Les Trebouxiophycées regroupent des algues de morphologie très simple, sans écailles ni flagelle et le chloroplaste est unique et sans pyrénoloïde.

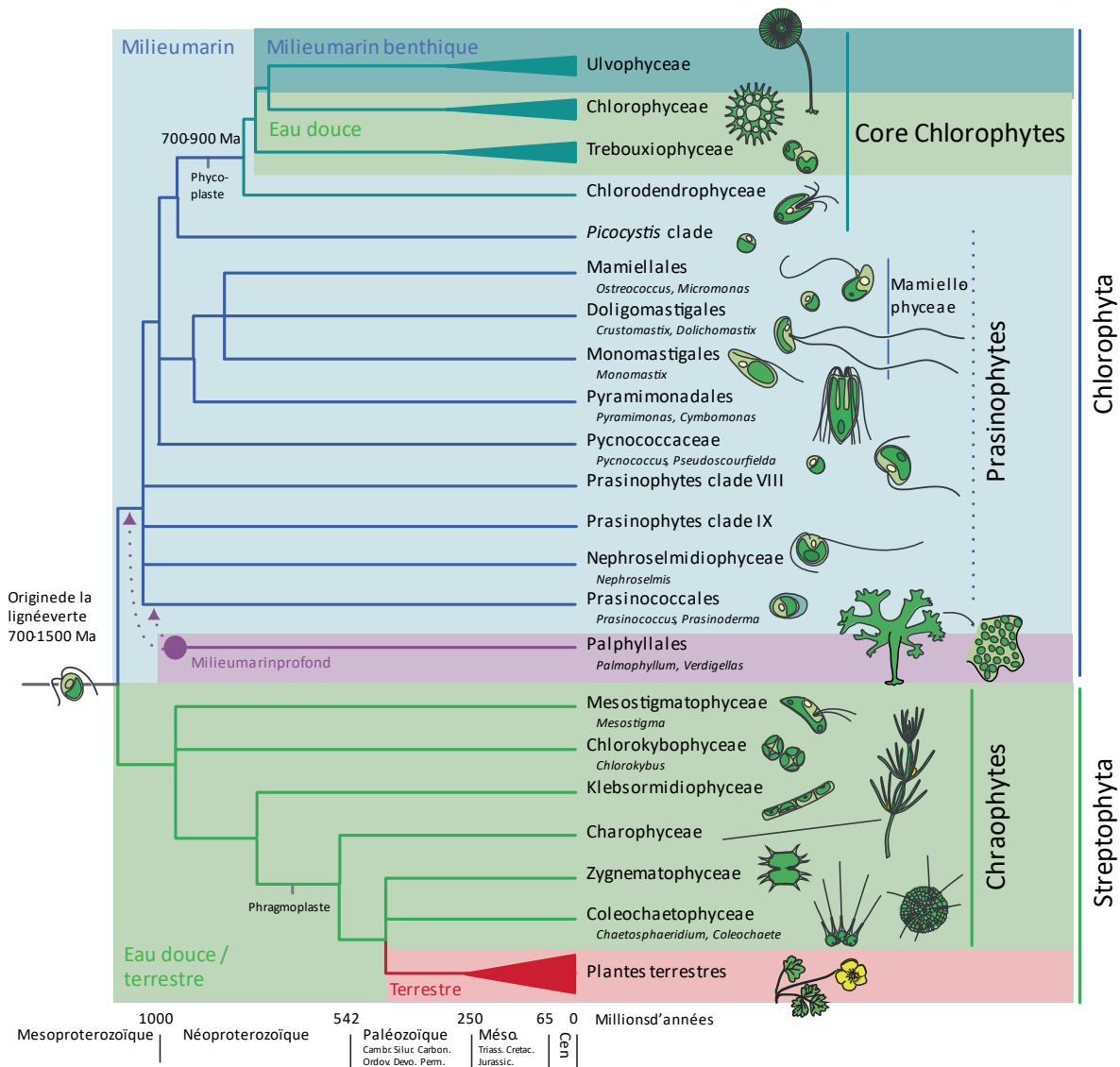


Figure 4. Phylogénie des Archaeplastida (Leliaert et al., 2011).

1.4. LES MAMIELLOPHYCEAE

Les Mamiellophyceae forment une classe (*classis nova*) d'algues vertes (Chlorophyta) qui contient certains des groupes de picoeucaryotes photosynthétiques (diamètre des cellules < 3 μm) les plus importants du point de vue écologique des milieux marins (Massana, 2011). Plusieurs études récentes ont mis en évidence une très large distribution géographique des espèces de la classe des Mamiellophyceae dans de nombreuses zones côtières mais aussi en

haute mer (Marin and Melkonian, 2010; Tragin and Vaultot, 2019; Vaultot et al., 2008). Ce phytoplancton peut atteindre des densités de population équivalentes à 10^3 à 10^5 cellules/ml d'eau de mer (Countway and Caron, 2006), il possède ainsi un rôle écologique clé dans les réseaux alimentaires marins et les écosystèmes qu'il a colonisés. Ces picoalgues illustrent le succès écologique des cellules eucaryotes miniaturisées : elles présentent une organisation cellulaire simple (une mitochondrie et un chloroplaste) et un rapport surface-volume élevé (Courties et al., 1994) (**Figure 5**), un caractère avantageux dans les environnements oligotrophes (Schaum et al., 2013).

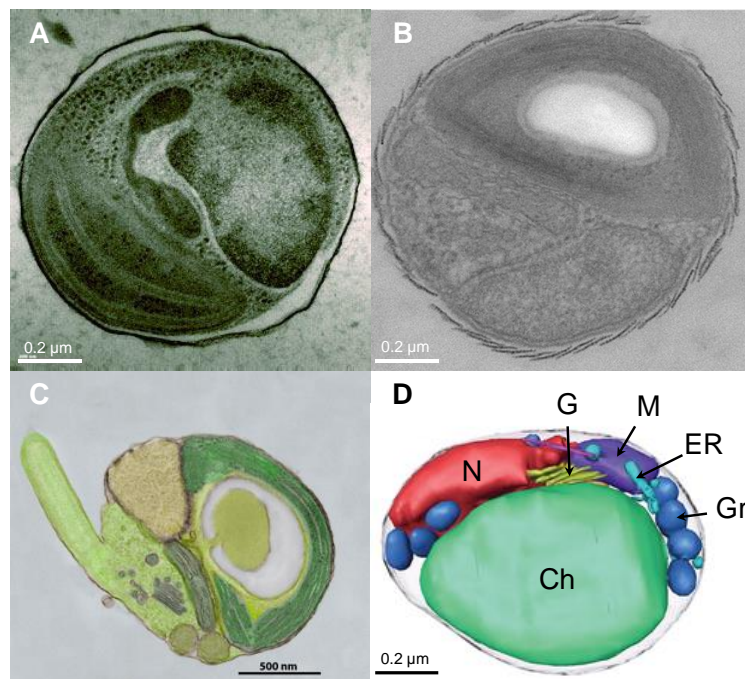


Figure 5. Morphologie des Mamiellophyceae. Observations au microscope électronique à transmission d'*Ostreococcus tauri* (A), *Bathycoccus prasinos* (B) et *Micromonas pusilla* (C). Ultrastructure 3D d'*O. tauri* générée par cryotomographie électronique (D). Ch : chloroplaste ; ER : réticulum endoplasmique ; G : appareil de Golgi ; Gr : Granules ; M : mitochondrie ; N : noyau. Sources : Hohmann-Marriott, NIH (A) ; (Moreau et al., 2012) (B) ; Deerinck, Terada, Obiyashi, Ellisman (National Center for Microscopy and Imaging Research) and Worden (MBARI) (C) ; (Henderson et al., 2007) (D).

L'une des principales caractéristiques morphologiques de la classe des Mamiellophyceae est la présence d'écailles non minérales (polysaccharides) à la surface des cellules et des flagelles (s'ils sont présents). Ce trait n'est pour autant pas toujours conservé au sein des différents genres. Enfin les Mamiellophyceae possèdent les pigments photosynthétiques

de la lignées vertes (chlorophylle *a* et *b*) en plus de la prasinoxanthine caractéristique des Prasinophytes (Foss et al., 1984).

Les Mamiellophyceae sont divisés en trois ordres : Monomastigales, Dolichomastigales et Mamiellales. Les ordres Monomastigales et Dolichomastigales contiennent respectivement les familles Monomastigaceae, Dolichomastigaceae et Crustomastigaceae. Les Mamiellales contiennent les familles Mamiellaceae composée des genres *Micromonas* et *Mantoniella* et Bathycoocaceae composée des genres *Ostreococcus* et *Bathyococcus* (Marin and Melkonian, 2010). Morphologiquement les écailles sont absentes chez les *Ostreococcus* et les *Micromonas*, tandis que les flagelles sont également absentes chez *Ostreococcus* et *Bathyococcus*. Certains genres, tels que *Micromonas*, *Mamiella*, *Mantoniella*, *Dolichomastix*, *Crustomastix* et *Monomastix* possèdent 1 ou 2 flagelles (Monomastix). Les Doligomastigales sont le groupe le plus diversifié et comporte uniquement des espèces d'eau douces (Monier et al., 2016) tandis que les chez les Mamiellales les espèces décrites sont essentiellement marines.

1.5. PHYLOGENIE DES VIRUS DES MICROALGUES DU PHYTOPLANCTON EUCARYOTE

1.5.1. HISTORIQUE

La première description faite d'un virus est attribuée à deux chercheurs qui travaillaient indépendamment sur la maladie de la mosaïque du tabac. En 1892, le biologiste russe Dimitri Ivanovski démontre que la maladie est due à un agent infectieux filtrant qui ne peut pas être bactérien. En 1898, le hollandais Martinus Beijerinck vient compléter cette observation en démontrant la diffusion du pathogène au travers d'un gel d'agar : il le définit comme un agent infectieux soluble (*contagium vivum fluidum*) (Lecoq, 2001). Il sera le premier à appeler « virus » l'agent causal de la mosaïque du tabac. Cependant, ce n'est qu'à la fin des années 1930 que les virus purent être observés pour la première fois grâce à l'invention de la microscopie électronique (Kausche et al., 1939). Par ailleurs, il faudra attendre les années 1950 pour qu'une définition précise des virus soit proposée par le biologiste français André Lwoff, décrivant les virus comme des parasites intracellulaires absolus, ne se reproduisant qu'à partir de leur matériel génétique et par réplication grâce à la machinerie cellulaire de leur hôte. Enfin, les virus ne contiennent qu'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui constitue leur génome viral.

Il est intéressant d'observer que les virus sont souvent évoqués au travers de leur pathogénicité mais les interactions hôte-virus les plus répandues sont commensales et

mutualistes (Roossinck and Bazán, 2017). Cette diversité d'interactions s'accompagne d'une diversité de mécanismes moléculaires considérable.

1.5.2. STRUCTURE ET CARACTERISTIQUES DES VIRUS

Les virus sont constitués d'une capsid, un ensemble d'unités protéiques qui structuré autour du génome viral. Le rapport géométrique des différentes unités protéiques aboutit à trois formes caractéristiques de capsides : les capsides à symétrie hélicoïdale, icosaédrique (20 faces) ou encore mixte avec une tête icosaédrique et une queue hélicoïdale (bactériophages) (**Figure 6**). Cette capsid peut elle-même être incluse dans une enveloppe de nature lipoprotéique selon la classe de virus. Enfin, le génome viral se décline sous plusieurs formes selon la nature du virus et peut être constitué d'ADN, d'ARN, simple ou double brin, linéaire ou circulaire.

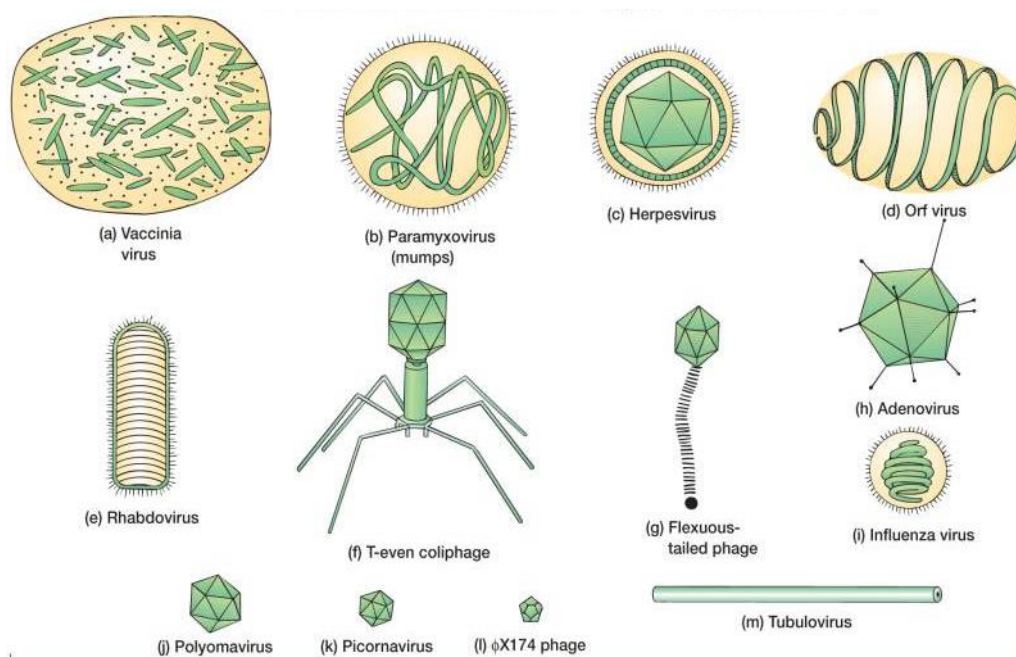


Figure 6. Diversité structurelle des virus. En vert sont représentées les capsides à symétrie hélicoïdale (**a, b, d, e, i, m**), icosaédrique (**c, h, j, k, l**) ou encore mixte (**f, g**). En jaune sont représentées les enveloppes des virus.

Il existe deux processus de réplication virale majoritaires : la réplication lytique et la réplication lysogénique. Toutes les deux reposent sur la reconnaissance par le virus de son hôte et le contournement de son système immunitaire afin de pouvoir pénétrer et détourner le métabolisme cellulaire hôte afin de se répliquer à l'intérieur de celui-ci. Dans le cadre de la

réplication lytique, à la suite de l'assemblage de l'ADN viral et des différents éléments de la capsidie dans la cellule hôte, les nouvelles particules virales sont libérées par lyse cellulaire. Dans le cas de la réplication lysogénique une phase de latence est observée ; après entrée dans la cellule le génome viral est incorporé au génome de l'hôte. Ainsi, le génome viral est répliqué avec celui de son hôte lors des phases de division cellulaire. A l'occasion de stress ou conditions environnementales particulières la phase lysogénique peut basculer vers une phase lytique où les particules virales seront produites et dispersées. Cette capacité d'infection est conditionnée par le spectre d'hôte du virus, c'est-à-dire sa capacité à reconnaître une cellule ou organisme hôte dans lequel il va pouvoir réaliser son cycle de réplication en contournant ses défenses, détournant son métabolisme et enfin induisant sa mort dans le cas d'une interaction antagoniste (pathogène). Bien souvent les virus ont une spécificité à un spectre restreint d'hôte, réduit parfois même à des souches particulières au sein d'une même espèce (Baudoux et al., 2015; Clerissi et al., 2012; Yau et al., 2020).

1.5.3. IMPACTS DES VIRUS MARINS SUR LEURS ECOSYSTEMES

L'observation du premier virus marin, un bactériophage, est réalisée par Spencer en 1955 (Spencer, 1955). Ce n'est toutefois qu'au début des années 1990 que la virologie marine connaît un essor particulier, on découvre alors que les virus marins sont les entités biologiques les plus abondantes dans les océans (Bergh et al., 1989) et qu'ils exercent à ce titre une pression majeure sur les écosystèmes et leur évolution (Middelboe and Brussaard, 2017). Il est estimé que 20 à 40% des microorganismes marins et 25% des populations phytoplanctoniques sont lysées chaque jour par des virus (Suttle, 2007). La mort induite par les virus d'une large part de la vie marine libère dans l'environnement de nombreux éléments cellulaires (débris) qui vont constituer un réservoir de matière organique dissoutes (MOD) et de minéraux. La MOD sera une source nutritive pour les organismes hétérotrophes du milieu et les minéraux seront réassimilés par la fraction photosynthétique du plancton (Poore et al., 2004). Ce phénomène est appelé « *shunt viral* » car le carbone fixé par le plancton n'est pas transféré aux niveaux trophiques supérieurs mais sera recyclé par ce même plancton (Wilhelm and Suttle, 1999). Ainsi, entre 2 à 26% du carbone fixé par le phytoplancton serait recyclé en MOD par la lyse virale.

En contrôlant les populations planctoniques, les virus agissent directement sur la disponibilité des éléments nutritifs et donc sur le déroulement des cycles biogéochimiques. Ils ont ainsi une influence à l'échelle planétaire qui va bien au-delà de l'effet sur la communauté

planctonique infectée. Le cas le plus remarquable est le relargage de molécules soufrées (diméthylsulfure – DMS et diméthylsulfoniopropionate – DMSP) par les populations planctoniques lysées qui agissent en tant que catalyseurs dans la formation des nuages et de pluies acides (Bratbak et al., 1995). Par ailleurs, DMS et DMSP renforcent l'albedo, réduisant l'irradiation et stabilisant ainsi les températures de l'atmosphère terrestre (Charlson et al., 1987).

1.5.4. LES VIRUS DU PHYTOPLANCTON

Plusieurs analyses métagénomiques récentes ont permis de révéler une diversité génétique spectaculaire de virus marins (Gong et al., 2018; Gregory et al., 2019). Si la plupart des virus marins sont des bactériophages (Breitbart, 2012), les virus qui infectent le phytoplancton eucaryote appartenant au groupe des NCLDV (*NucleoCytoplasmic Large DNA Viruses*, grand virus nucléocytoplasmique) représenterait jusqu'à 10% de la diversité virale marine (Brussaard, 2004). Les NCLDV forment un groupe monophylétique et infectent de nombreux eucaryotes autres que le phytoplancton eucaryote (animaux et amibes) (Iyer et al., 2006). Dix familles composent ce groupe parmi lesquelles on retrouve les *Ascoviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Marseilleviridae*, *Megaviridae*, *Mimiviridae*, *Pandoraviridae*, *Pithoviridae*, *Poxviridae* et les *Phycodnaviridae* (Abergel et al., 2015) (**Figure 7**). Les virus des NCLDV ont pour particularité de se répliquer dans le cytoplasme. Les *Phycodnaviridae* sont caractérisés par une capsidie icosaédrique d'une taille comprise entre 100 et 220 nm (ce qui en fait des virus géants), l'absence de queue et d'enveloppe autour de la capsidie, ce qui en font des virus structurellement très proches des Herpèsvirus (**Figure 6c**). Les génomes sont à ADN double brin composé de 170 à 560 kilo paires de bases (Van Etten et al., 2010). L'identification des espèces repose sur deux marqueurs moléculaires : la séquence de la polymérase B (*polB*) et la séquence de protéine de la capsidie majeure (MCP : Major Capsidie Protein). La famille des *Phycodnaviridae* est composée de sept genres nommés d'après les espèces qu'ils infectent : *Chlorovirus*, *Coccolithovirus*, *Mimiviridae*, *Prasinovirus*, *Prymnesiovirus*, *Phaeovirus* et *Raphidovirus* (Maruyama and Ueki, 2016).

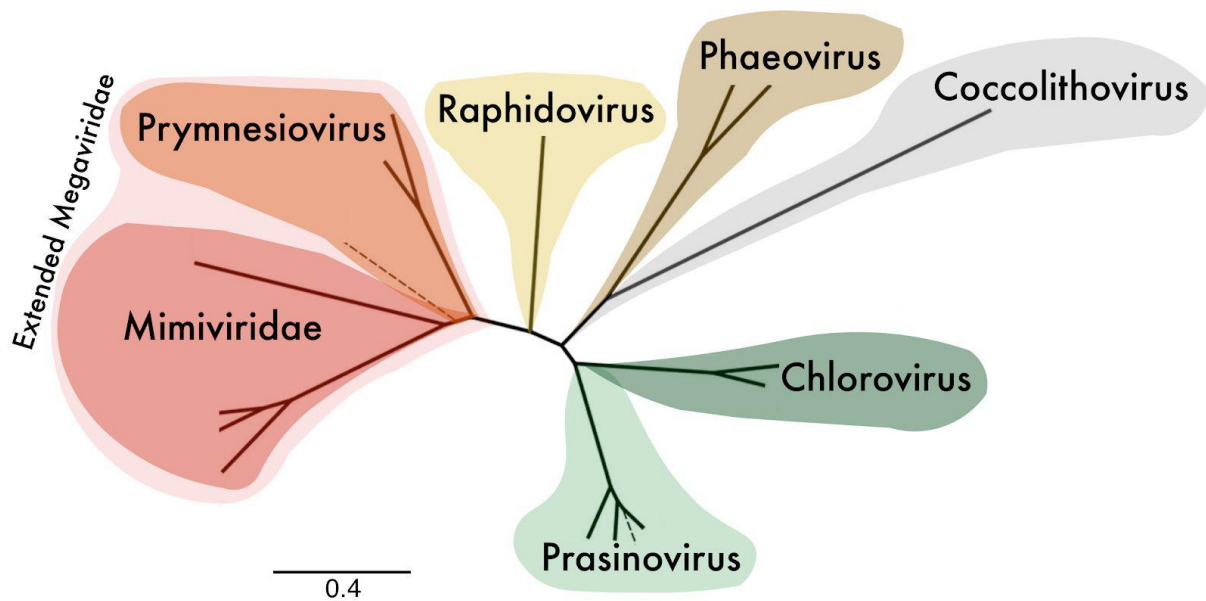


Figure 7. Phylogénie des Phycodnavirus (Maruyama and Ueki, 2016).

Les *Prasinovirus* sont également un genre monophylétique. Les souches décrites infectent trois genres de microalgues de la famille des *Mamiellophyceae* : le premier *Prasinovirus* décrit fût MpV (*Micromonas pusilla* Virus), un virus infectant le genre *Micromonas* (Mayer and Taylor, 1979), BpV infectent les algues du genre *Bathycoccus* tandis que l'on distingue les souches infectant le genre *Ostreococcus* ; OtV infecte l'espèce *Ostreococcus tauri*, OmV infecte *O. mediterraneus*, enfin OIV infecte *O. lucimarinus* (**Figure 8**). Le spectre d'infection d'une souche de *Prasinovirus* est souvent limité à quelques souches de microalgues au sein d'une même espèce (Clerissi et al., 2012; Yau et al., 2020).

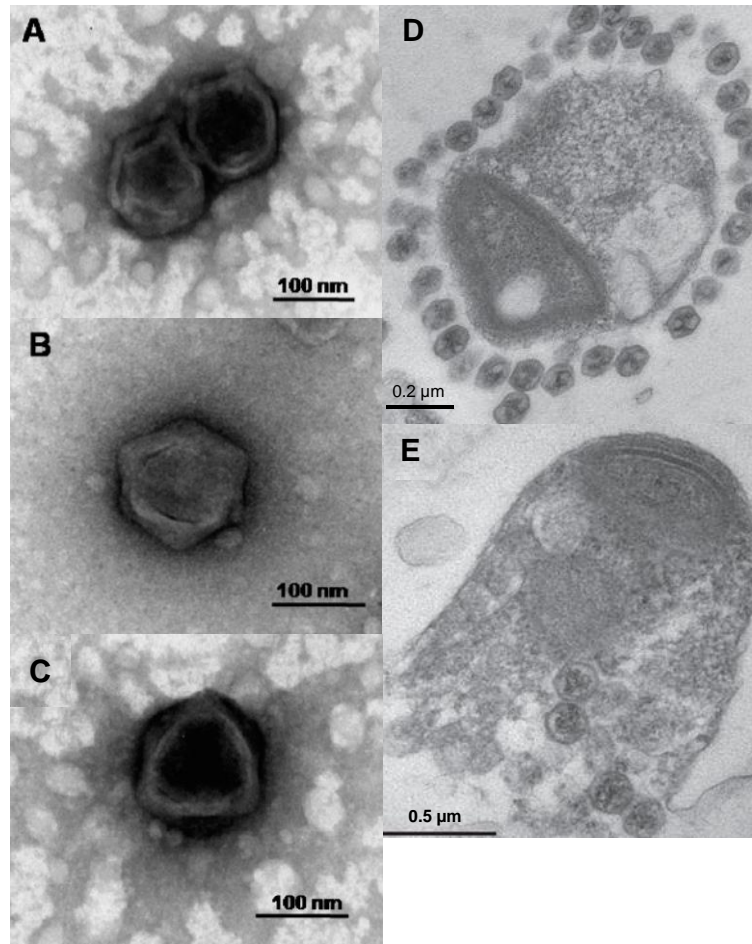


Figure 8. Morphologie des Prasinovirus. Observations de virus au microscope à transmission électronique. Micromonas pusilla virus (MpV) (A, B), Ostreococcus tauri virus 5 (OtV5) (C) (Weynberg et al., 2017), virus OtV5 ancrés à la membrane de leur hôte *O. tauri* (D) et lyse d'*O. tauri* et dispersion des particules virales OtV5 (E) (Bellec and Desdevises, 2015).

2. ÉTUDE DES INTERACTIONS MICROALGUES-VIRUS

2.1. DYNAMIQUE HÔTE-VIRUS : LA NOTION DE PHÉNOTYPE IMMUNITAIRE

Les systèmes hôte-virus semblent ubiquistes, d'après Thingstad tous les organismes sont susceptibles d'être infectés par au moins virus, et c'est même vrai pour les virus eux-mêmes infectés par des virophages (virus de virus). Cependant, il apparaît que les virus n'infectent jamais tous les individus d'une même espèce, il existe donc une variabilité phénotypique qui s'exprime vraisemblablement au travers d'une diversité génétique, physiologique et différents mécanismes moléculaires. Ce constat conduit l'auteur à penser que les virus sont davantage spécifiques à une souche plutôt qu'à une espèce (Thingstad et al., 2015). C'est ainsi que l'on peut observer chez une même espèce plusieurs phénotypes face au virus (**Figure 9**). Ainsi au sein d'une population phytoplantonique unicellulaire un **phénotype résistant** peut se

développer en présence du virus, tandis qu'un **phénotype sensible** sera infecté et verra sa population décroître au gré de la **production de nouvelles particules virales**. La cinétique de lyse d'un virus est dépendante de sa virulence, c'est-à-dire la capacité à infecter rapidement un grand nombre d'hôte. Ce paramètre dépend très fortement du phénotype immunitaire de l'hôte. Un troisième phénotype, appelé **résistant producteur**, peut être observé et correspond développement parallèle de l'espèce hôte et de son virus, il illustre à l'échelle d'une population le phénomène de **coexistence hôte-virus** (Heath et al., 2017; Thomas et al., 2011; Yau et al., 2016, 2020).

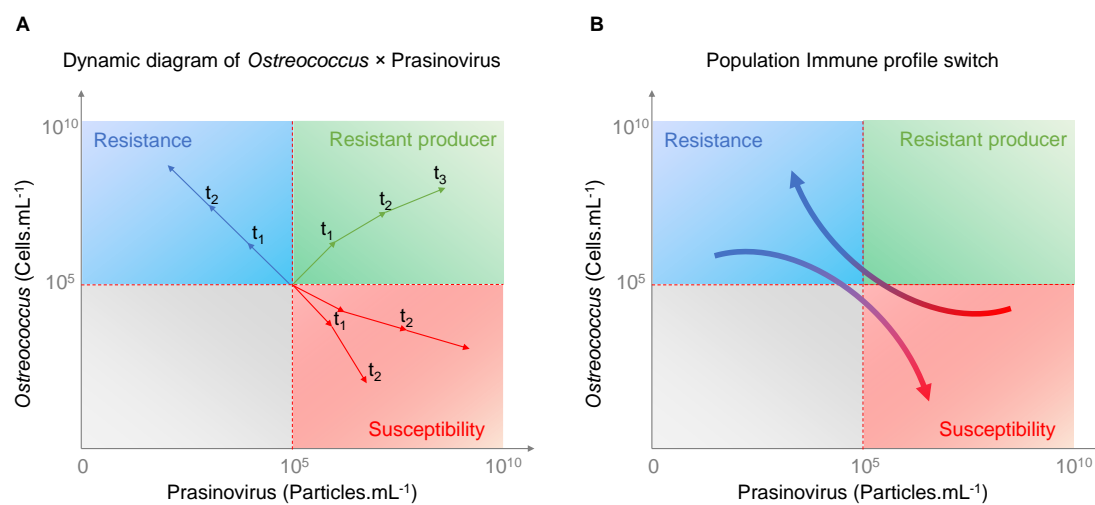


Figure 9. Diagramme d'interaction hôte-virus (A) et changement immunitaire à l'échelle de la population (B).

La coexistence du phytoplancton et de leurs virus associés au cours de l'évolution est jalonnée de questions qui tentent de comprendre comment l'équilibre entre les populations hôtes et virales peut être maintenu. Les virus sont des parasites obligatoires, ils limitent et compromettent très souvent les capacités et la survie (*fitness*) de leur hôte. Cependant, une proportion d'hôtes résistants doit subsister au risque de voir disparaître le système hôte-virus. Ce paradoxe a conduit à de nombreuses hypothèses qui permettent d'expliquer la coexistence de l'hôte et de son pathogène.

Certaines études suggèrent que la coexistence de l'hôte et de son ou ses virus associés est basée sur la forte dilution des deux partenaires dans l'environnement permettant un équilibre entre le taux de croissance de l'hôte et la lyse virale (Suttle, 2007). Ce contexte permet le maintien de profils immunitaires sensibles au virus dans l'environnement. Toutefois,

l'existence de phénotypes résistants aux virus marins parmi le plancton a rapidement été suspectée et mise en évidence par des expériences de dynamique de populations de phytoplancton infectées par des virus (Thyrhaug et al., 2003; Waterbury and Valois, 1993). Quatre populations monospécifiques composées des espèces phytoplanctoniques *Emiliania huxleyi*, *Chrysochromulina ericina*, *Phaeocystis pouchetii* et *Pyramimonas orientalis* ont été infectées par leurs virus respectifs ; Seulement quelques jours après l'ajout du virus, les populations phytoplanctoniques s'effondrent et atteignent des densités minimales de 10^3 cellules.ml⁻¹. Dans la même période, l'abondance virale augmente et atteint des densités de 10^8 à 10^9 particules.ml⁻¹. Après la période de lyse, le nombre d'algues augmente de façon exponentielle jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance, tandis que les populations virales restent stables par rapport aux algues dans le temps. Ces expériences démontrent que l'évolution de la résistance aux virus est très rapide au sein des populations de microalgues. La pression de sélection exercée par le virus favorise la sélection d'individus résistants qui constituent une nouvelle population immunisée.

Chez *Ostreococcus* la transition d'un phénotype de sensibilité vers un phénotype de résistance est observable rapidement (3 à 5 jours), ce à un faible taux au cours de chaque division cellulaire (Thomas et al., 2011; Yau et al., 2020). Toutefois, en l'absence d'une sélection virale, le phénotype sensible semble présenter une meilleure *fitness* : lors d'expériences de co-cultures, le phénotype résistant disparaît au profit du sensible. De manière plus remarquable, lors de la co-culture de souches résistantes et résistantes productrices, le nombre de particules virales décroît rapidement après plusieurs repiquages de la culture. Cela suggère une élimination des souches « résistantes productrices » sur le long terme. D'autre part, la résistance est un caractère persistant qui semble se maintenir sur plus de deux ans (Thomas et al., 2011). Par ailleurs, la transition vers la résistance semble intervenir de manière plus fréquente que la transition vers la sensibilité (Weynberg et al., 2017). Yau *et al.* ont récemment proposé un modèle mathématique afin d'expliquer le phénomène de coexistence de particules virales au sein d'une population résistante d'*O. mediterraneus* : ce modèle repose sur un taux de transition entre phénotype résistant et sensible identique et très faible (0.01). La production de nouvelles cellules susceptibles à chaque génération serait responsable de la production du virus (Yau et al., 2020).

2.2. LES DIFFERENTES ETAPES DE L'INFECTION VIRALE

Dès lors, les recherches se sont attachées à comprendre les mécanismes moléculaires et physiologiques de la résistance au virus. Ces mécanismes de résistance pourraient agir aux différents moments qui définissent les traits d'histoire de vie du virus c'est-à-dire : (i) le taux d'adsorption (nombre de particules virales attachées à la membrane hôte) ; (ii) la période de latence avant la réplication virale (temps entre l'attachement et l'assemblage du premier virion) ; (iii) le taux de maturation (nombre de virions assemblés par unité de temps) ; (iv) la période de latence, ou temps entre l'adsorption et la lyse de l'hôte et (v) le *burst size* (nombre de virions libérés).

L'**adsorption** est la première étape de l'infection virale, elle se produit au travers de la reconnaissance des récepteurs de la membrane de la cellule hôte par les récepteurs viraux ou des molécules d'adhésion cellulaire. L'absence d'adsorption constitue l'un des premiers mécanismes de résistance virale. Les microalgues *Heterosigma akashiwo* (Stramenopila, algue brune) et *Ostreococcus tauri*, respectivement résistantes aux virus *Heterosigma akashiwo* Virus 01 et *Ostreococcus tauri* Virus 5, présentent une diminution significative d'adhésion des particules virales à la membrane de la cellule hôte (Derelle et al., 2018; Tarutani et al., 2006; Yau et al., 2016). Le défaut d'adsorption virale peut provenir de (i) la modification de la structure des récepteurs, (ii) l'altération de l'accessibilité des récepteurs, (iii) la diminution du nombre de récepteurs à la surface des cellules, et/ou (iv) la perte de sites récepteurs mais ces mécanismes de défense ne sont pas décrits chez le phytoplancton eucaryote et dérivent le plus souvent de l'étude de systèmes hôte-virus de type bactérie-bactériophage (Labrie et al., 2010). Les récepteurs sont de nature complexe, constitués de protéines, d'acides organiques ou encore de lipides, incorporés dans des structures elles-mêmes complexes (membranes cytoplasmiques hôte, membrane ou capsid virale) (Baranowski, 2001; Maginnis, 2018; Sobhy, 2017). Les récepteurs viraux les plus courants sont (i) les molécules d'adhésion cellulaires, parmi lesquelles sont retrouvées les glycoprotéines de la superfamille des immunoglobines (IgSF) et les intégrines, des protéines transmembranaires dont la partie externe interagit avec le virus et la partie interne avec les constituants intracellulaires. (ii) Les récepteurs à phosphatidylsérine (PtdSer receptor) de type TIM (T-cell immunoglobulin-mucin domain) et TAM (Tyro3/Axl/Mer receptor). (iii) Les récepteurs de type glycoprotéines ou glycolipides constitués d'acide sialique (SA) (**Figure 10**). Ces derniers sont suspectés de jouer un rôle dans l'infection de l'haptophyte *Emiliania huxleyi* par son virus associé *Emiliania huxleyi* virus (EhV) (Fulton et al., 2014). Une analyse métabolomique de la microalgue et de son virus a mis en évidence

un monosialylcéramide : un sphingolipide de type céramide avec un acide sialique pour tête polaire appelé sialic acid viral sphingolipid (sGSL) (**Figure 11**). Parmi onze souches d'*E. huxleyi* étudiée, une corrélation a été trouvée entre la teneur en sGSL chez l'hôte et la sensibilité au virus EhV puisque la teneur en sGSL chez l'hôte augmente de manière exponentielle au cours de l'infection. Par ailleurs, le sGSL est un constituant abondant du virus (15%), localisé probablement dans sa membrane. L'ensemble de ces observations laisse supposer que le sGSL serait un métabolite clé de l'interaction et la reconnaissance hôte-virus. L'acide sialique est un métabolite abondant au niveau de la membrane externe des cellules eucaryotes. Constituant des groupes terminaux sur les gangliosides et les glycoprotéines, l'acide sialique facilite les liaisons hydrogènes polaires et les ponts salins et participe également aux interactions non polaires (Neu et al., 2011). L'acide sialique semble impliqué dans la reconnaissance hôte-virus dans de très nombreux cas : aussi bien pour des virus enveloppés comme ceux de la grippe (Influenza A, B, C et Parainfluenza) ou non enveloppés comme les Adénovirus de type D (ADN double brin) et les polyomavirus (Neu et al., 2011; Stray et al., 2000). Il est suspecté que l'acquisition de la résistance au travers de la modification du nombre ou de la nature des récepteurs membranaires se fait au travers de mutations spontanées aussi bien chez l'hôte que son virus. Un virus mutant de *Micromonas pusilla* devenait ainsi virulent auprès de la microalgue alors résistante à la version non mutée du virus (Waters and Chan, 1982). Un autre mécanisme de résistance a été décrit chez la microalgue rouge *Porphyridium sp.* qui sécrète des polysaccharides sulfatés à la surface de sa membrane cellulaire afin d'empêcher l'accès du virus Herpes simplex à ses récepteurs (Huheihel et al., 2002). Toutefois, une modification des récepteurs membranaires des cellules hôtes est susceptible d'influencer la capacité des cellules résistantes à interagir avec leur environnement. Ainsi, Middleboe démontre qu'une modification des lipopolysaccharides membranaires de cyanobactéries résistantes est associée à une réduction de *fitness*, il suggère que les individus résistants sont désavantagés par rapport aux cellules sensibles pour l'absorption des nutriments (Middelboe, 2000).

glucanase, et une alginase (Yanai-Balser et al., 2010). Toutefois, chaque stratégie d'entrée est propre au couple hôte-virus.

La **réplication virale** est également une étape clé de l'infection qui peut être contournée par l'hôte. Cependant, chez le phytoplancton le seul cas étudié concerne l'algue dinoflagellé *Heterocapsa circularisquama* qui est capable de bloquer la réplication du génome viral du HcRNAV (Tomaru et al., 2009). Les auteurs ont introduit de l'ARN viral dans des cellules phytoplanctoniques résistantes au virus. Cet ARN n'est pas transcrit de même qu'après infection par le virus, démontrant ainsi que la microalgue n'est pas permissive à la réplication. Toutefois, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette résistance demeurent totalement inconnus.

La **dissémination** des particules virales semble être aussi un levier de contrôle de l'infection par l'hôte déjà contaminé. Thomas *et al.* ont mis en évidence un phénomène de production et de dissémination d'un faible nombre de particules virale chez la microalgue *Ostreococcus tauri* résistante au virus OtV5 (Thomas et al., 2011). Les auteurs avaient alors émis l'hypothèse que la souche de microalgue alors appelée « résistante productrice » était capable de produire une à trois particules virales par jour et par cellule sans aucune lyse, au travers de vésicules formées à la surface de la membrane hôte. Cette hypothèse n'a pas été confirmée à ce jour.

2.3. LES CARACTERISTIQUES GENOMIQUES DE LA RESISTANCE DU SYSTEME *OSTREOCOCCUS-PRASINOVIRUS*

Une caractéristique conservée dans tous les génomes des Mamiellales séquencés à ce jour est la présence de deux chromosomes particuliers appelés chromosomes *outliers* : ils présentent des différences de structure, de composition et de taille très marquées par rapport aux autres chromosomes. Chez *Ostreococcus tauri*, ce sont le **chromosome 2** (*Big Outlier Chromosome* ou **BOC**) et le **chromosome 19** (*Small Outlier Chromosome* ou **SOC**). Chez *Micromonas pusilla*, l'ordre des chromosomes est conservé tandis que chez *Micromonas commoda* le BOC correspond au chromosome 1 tandis que le SOC au chromosome 17 (Verhelst et al., 2013), enfin chez *Bathycoccus* les chromosomes *outliers* sont le 14 (BOC) et le 19 (SOC) (Moreau et al., 2012). Le SOC présente une plasticité de taille remarquable au sein des populations naturelles et des différentes souches de laboratoire d'*Ostreococcus* puisque sa taille varie entre 280 et 436 kilo paires de bases (Blanc-Mathieu et al., 2017; Subirana et al., 2013; Yau et al., 2016). En ce sens, sa taille est positivement corrélée à la résistance virale car les

souches résistantes à un large spectre de virus possèdent un chromosome 19 plus long (Blanc-Mathieu et al., 2017). Cette augmentation de taille est associée à des réarrangements de portions de chromosomes, associés à des délétions et des duplications de grandes parties du chromosome. De tels réarrangements peuvent provoquer l'altération de l'expression de certains gènes à l'origine de changements adaptatifs qui se traduisent au travers des différents profils de susceptibilités face au virus.

L'analyse transcriptomique de souches d'*O. tauri* résistantes et sensibles au virus OtV5 a permis de mettre en évidence des changements transcriptionnels importants au niveau du chromosome 19. Les gènes du SOC codent essentiellement des protéines de type méthyltransférase et glycosyltransférase et des protéines associée au métabolisme du carbone (Yau et al., 2016). Ces gènes sont massivement sur-exprimés dans les souches résistantes au virus par rapport à celles sensibles et se situent sur une portion particulière du chromosome 19. En effet, le SOC présente une structure bipartite : dans les souches résistantes au virus ce sont les gènes de la partie gauche du chromosome qui sont fortement exprimés tandis que ceux de la partie droite sont quasiment réprimés. L'expression inverse se produit chez les souches sensibles. Par ailleurs, les gènes sur-exprimés par les souches résistantes sont localisés dans de larges régions inverses répétées (LIRR : Large Inverted Repeat Region) et au sein d'un rétrotransposon. Les répétitions inversées comme les rétrotransposons jouent un rôle important dans l'instabilité des génomes (Voineagu et al., 2008), contribuant ainsi à la diversité et l'adaptation génétique. Pour compléter le caractère muable du chromosome 19, celui-ci capte 20% des 400 éléments transposables (ET) recensés chez *O. tauri* (la plupart des autres ET étant localisés sur le BOC) (Grimsley et al., 2015).

Plus récemment une analyse temporelle (jour/nuit, 12/12) transcriptomique de souches d'*O. tauri* susceptibles infectée avec OtV5 et non infectées a été réalisée (Derelle et al., 2018). Cette analyse révèle une forte induction (jusqu'à 420 fois supérieur à l'expression du gène de la souche témoin) de l'expression d'une transcriptase inverse sur le chromosome 8 lors de la période de division cellulaire (qui intervient en fin de la phase claire : deux heures avant et six heures après le début de la phase sombre). Cette transcriptase inverse est supposée coder pour la réplicase et l'intégrase d'un transposon de type I qui n'est pas transcrit dans les cellules non infectées. Les auteurs proposent que la transcription de la transcriptase inverse soit induite par l'attaque virale, permettant la transposition du gène lui-même et l'activation du rétrotransposon du chromosome 19. Une telle activation induirait un réarrangement chromosomique suspecté de promouvoir l'expression de certains gènes du chromosome 19. D'ailleurs les gènes du SOC

sont exprimés de manière forte et tardivement dans la culture infectée, indiquant peut-être que les cellules sont très certainement devenues résistantes au virus.

L'ensemble des travaux menés sur le génome et le transcriptome d'*O. tauri* suggère une implication du chromosome 19 dans l'immunité de la microalgue. Toutefois, on ne sait pas si les SOC d'autres genres de Mamiellales comme *Bathycoccus* et *Micromonas* ont le même rôle immunitaire (Moreau et al., 2012) bien qu'une résistance virale ait été observée chez ces espèces contre leur virus spécifiques BpV2 (*Bathycoccus prasinus* Virus 2) et MpV1 (*Micromonas pusilla* Virus 1) (Thomas et al., 2011). La présence de chromosomes *outliers* pourrait être une spécificité d'un nombre restreint d'espèces et de genre et la résistance antivirale associée à d'autres mécanismes génétiques. D'autre part certaines microalgues des genres *Mamiella* et *Mantoniella* présentent une très faible susceptibilité de manière générale aux virus testés, indiquant une immunité à un très large spectre de virus ou une incompatibilité totale de reconnaissance hôte-virus (Subirana et al., 2013). De ce fait les mécanismes de défenses ont pu évoluer de manières très différentes au sein de la lignée des Mamiellales et être spécifiques au couple hôte-virus.

3. APPROCHE METABOLOMIQUE DANS L'ETUDE DES INTERACTIONS MICROALGUES-VIRUS

Dans les paragraphes suivants nous définirons les concepts de la métabolomique, puis nous traiterons des différentes classes de composés (glycérolipides, sphingolipides, phytostérols) et les voies métaboliques qui leurs sont associées dont nous parlerons en détails tout au long de ce manuscrit.

3.1.METHODOLOGIE, DEFINITIONS ET CONCEPTS.

La métabolomique est définie en biologie comme l'ensemble des méthodes et outils utilisés pour l'étude du métabolome, lui-même défini comme l'ensemble des molécules de petite taille (< 2000 Daltons) qui composent un organisme. Les termes métabolome et métabolomique dérivent par analogie des termes génome, transcriptome, protéome et leurs outils 'omiques' associés. Bien que couramment utilisés aujourd'hui, métabolome et métabolomique sont des néologismes récents que les publications ne mentionnent que depuis 1998 (Alseekh and Fernie, 2018). Toutefois, l'étude des métabolites est vraisemblablement une pratique millénaire, puisque des récits font état du dosage du glucose dans l'urine par la médecine chinoise il y a 4000 ans. Cette approche empirique consistait à utiliser et compter le nombre de fourmis se dirigeant vers le fluide, l'urine riche en glucose d'une personne diabétique

comptait alors plus de fourmis que l'urine d'une personne saine. Les méthodes empiriques d'analyse des métabolites seront nombreuses à travers les époques, de l'Égypte à la Grèce antique où elles donneront naissance à la *théorie des humeurs* d'Hippocrate au travers de l'analyse des fluides du corps humain. L'étude des métabolites a servi d'autres disciplines comme la classification. En 1751, Carl von Linné suggère que les plantes partageant des caractères morphologiques similaires partagent également une composition chimique similaire. Les métabolites allaient être utilisés comme caractère discriminant en taxonomie. Ainsi, les pigments figurent parmi les premiers métabolites étudiés, ils seront d'ailleurs largement utilisés dans pour l'identification et la classification des algues.

Aujourd'hui une classification des métabolites a émergé, on distingue ainsi les **métabolites primaires**, essentiels au développement et à la vie d'un organisme, qu'ils soient précurseurs (acides aminés, acides gras, oses), intermédiaires ou produits finaux des voies de biosynthèse et voies métaboliques et les **métabolites secondaires** (aussi appelés spécialisés) majoritairement impliqués dans l'adaptation de l'organisme à son environnement. De fait, les métabolites sont les marqueurs directs de l'activité biologique d'un organisme et sont soumis à une forte dynamique, tant en terme d'abondance que de localisation cellulaire (Patti et al., 2012) sous l'effet des différents stimuli reçus, qu'ils soient internes (développementaux) ou externes (environnementaux, pathogènes etc...) (Collino et al., 2013). Le nombre de métabolites primaires et secondaires dépend fortement de l'organisme considéré. La lignée verte semble contenir la plus grande diversité métabolique avec 200 000 métabolites recensés et 1 million de composés estimés (Afendi et al., 2012; Saito and Matsuda, 2010), tandis que la base de données du métabolome humain (HMDB 4.0) recense près de 115 000 composés (Wishart et al., 2018) et la base de données d'*Escherichia coli* (ECMDB 2.0) environ 3800 molécules (Sajed et al., 2016). Les bases de données sont un outil fondamental d'aide à l'identification de molécules en métabolomique, car elles centralisent de nombreuses informations sur ces molécules comme les données spectrales (UV, masse, RMN), les voies de biosynthèse (gènes et enzymes impliquées dans la voie), les voies métaboliques, leurs fonctions, leur rôle marqueur dans le cas de pathologie, leur occurrence chez les organismes etc... Toutefois, parvenir à identifier une molécule, c'est-à-dire déterminer sa structure exacte et notamment sa stéréochimie (arrangement spatial des atomes) est une tâche complexe fortement dépendante de l'outil d'analyse utilisé. Sans RMN ou standard analytique de comparaison, il sera généralement fait mention « d'annotation » plutôt que « d'identification ».

3.2.METHODES D'EXTRACTIONS, D'ANALYSES, ANNOTATION ET IDENTIFICATION.

Chaque métabolite ou du moins classe de métabolites possède des propriétés chimiques particulières. La polarité, c'est-à-dire la répartition des charges électriques négatives et positives au sein de la molécule conditionne sa solubilité dans un solvant donné. Les acides organiques et les sucres sont des molécules très polaire, contrairement aux acides gras relativement apolaires. C'est sur ce principe de polarité que sont basés les méthodes d'extraction et d'analyse des métabolites comme la chromatographie liquide et gazeuse. Dans le cas de l'extraction il faudra choisir un solvant de polarité identique à la classe de métabolites à analyser (un solvant polaire extrait préférentiellement des métabolites polaires). De ce fait seulement une partie du métabolome peut être étudié au travers d'un seul protocole.

L'extraction

Les algues vertes sont des organismes connus pour leur forte teneur en lipides : lipides neutres (apolaires) et lipides polaires pouvant représenter plus de 40 % du poids sec (Arif et al., 2020). Historiquement l'étude des lipides chez les algues repose sur deux méthodes d'extraction à base de chloroforme/méthanol : celle développée par Folch est basée sur une proportion relative de 2/1 (volume/volume) (Folch et al., 1957) et celle de Bligh et Dyer sur une proportion relative de 1/2 (v/v) (Bligh and Dyer, 1959). Ces extractions biphasiques permettent de récupérer les lipides dans la phase chloroforme. Par la suite, des améliorations ont été apportées à ces protocoles dans le but d'augmenter la quantité de matière extraite et de se débarrasser des sels. Elles reposent souvent sur l'ajout d'un troisième solvant, eau ou éthanol dans lesquels les sels sont mieux solubilisés (Fulton et al., 2014; Rosenwasser et al., 2014; Simionato et al., 2013; Vidoudez and Pohnert, 2012). Ainsi, la méthode développée par Matyash *et al.* semble à ce jour la mieux adaptée et rapide à mettre en œuvre pour les analyses lipidomiques : le mélange de solvants utilisé est composé de méthanol/méthyle tert-butyl éther/eau (1.5/5/1.25) (Matyash et al., 2008). Dans le cas d'analyse métabolomique d'algues unicellulaires le matériel biologique est préalablement filtré afin de concentrer et séparer les cellules du milieu de culture.

Les méthodes d'analyse en métabolomique

La méthode la plus largement utilisée est la chromatographie, c'est une technique séparative des différents constituants de l'extrait basée sur la différence d'affinité entre une phase stationnaire et mobile. La phase fixe est souvent une colonne et la phase mobile peut être gazeuse ou liquide. Ainsi, on peut distinguer la chromatographie sur couche mince dont la phase stationnaire est planaire (1D ou 2D). Elle fut largement utilisée pour l'analyse des pigments

photosynthétiques, elle est également utilisée pour séparer les différentes familles lipidiques dans le but de les purifier (Degraeve-Guilbault et al., 2017). On distingue aussi la chromatographie liquide sur colonne (LC) et la chromatographie gazeuse sur colonne (GC), pour lesquelles les phases mobiles sont respectivement des solvants liquides ou de l'azote gazeux. Enfin, la chromatographie ionique repose sur le principe d'affinité ionique et non polaire. Ces différents outils de séparation de l'extrait sont généralement reliés à un analyseur de type UV ou spectroscopie de masse (MS). Dans le cas de la spectroscopie de masse, l'analyseur détecte l'analyte sous forme d'un ensemble d'ions caractérisés par leur rapport mass/charge (m/z). Pour cela, le composé est ionisé avant son entrée dans l'analyseur. La chambre d'ionisation peut fonctionner selon deux principes, soit une ionisation 'dure' par impact électronique qui génère des radicaux chargés métastables, soit une ionisation 'douce' par ajout ou soustraction de protons. Cette dernière méthode génère des ions plus stables chimiquement et donc moins susceptibles de se fragmenter avant détection. Elle peut être réalisée par électro-spray (ESI), ionisation chimique (APCI) ou laser assisté par matrice (MALDI). Les ions formés sont alors séparés selon leur masse soit dans un quadripôle soumis à un courant alternatif (Q) soit selon leur temps de vol (TOF) ou encore selon leur fréquence d'oscillation axiale dans le cas de la spectrométrie de masse à trappe orbitale (*Orbitrap*). Cette liste n'est pas exhaustive mais ce sont les technologies les plus courantes, l'*Orbitrap* étant l'une des technologies les plus résolutive (séparation des différents ions) et sensible. Une fois séparés par leur taille, les ions peuvent éventuellement être dirigés vers une chambre de collision couplée à un séparateur de masse (MS^n) permettant d'analyser les fragments provenant des différents ions. Le signal généré par l'analyseur est quantitatif, il est représenté au travers d'un chromatogramme ionique (TIC). Cependant, l'étape d'ionisation induit généralement un biais car toutes les molécules ne sont pas ionisées de la même manière. Certains métabolites peuvent ainsi être moins bien ionisés donc moins bien détectés et quantifiés. Toutefois, l'analyse de profils lipidiques d'*Ostreococcus* menée au laboratoire grâce à un détecteur d'aérosol chargé (CAD), un dispositif très sensible donc très fiable d'un point de vue quantitatif, montre une excellente corrélation des profils CAD et TIC. L'utilisation d'un étalon interne peut également permettre une quantification plus fine du signal TIC. Bien que la chromatographie liquide soit moins résolutive que la chromatographie gazeuse (Lee et al., 2012), la GC ne peut analyser que les constituants volatiles d'un extrait, les sucres devant être *dérivatisés* pour être analysés.

Enfin, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est également utilisée en analyse métabolomique ainsi que pour l'analyse et la quantification de composés

purifiés. Cette technique a pour avantage de permettre l'élucidation complète de la structure d'un ou quelques composés en mélange. Toutefois, cela nécessite un travail de purification préalable du/des composés généralement par LC. Cette technique est moins sensible et moins adaptée à l'analyse de mélanges complexes au regard de la multitude de signaux qui seraient générés.

Le traitement des données

De nombreux outils informatiques de traitement des données ont émergé afin d'assister les analystes et d'accélérer le processus d'annotation des profils métabolomiques et l'analyse des spectres de masse. Les logiciels propriétaires payants comme Compound Discoverer (Thermo Scientific) offrent une grande facilité d'utilisation, ils assurent une analyse complète des données : alignement, correction des temps de rétentions et des écarts de masse, intégration des chromatogrammes, normalisation, analyses statistiques différentielles et annotation des ions/composés. Par ailleurs, de nombreuses solutions gratuites et à code source ouvert similaires dans les fonctions aux solutions payantes ont été développées. Les plus populaires sont MSDial (Tsugawa et al., 2020), MZmine (Pluskal et al., 2010), OpenMS (Röst et al., 2016) ou encore XCMS (Smith et al., 2006). Ces logiciels offrent par ailleurs une interopérabilité avec la plateforme d'analyse de similarité spectrale en réseau GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (Wang et al., 2016). Cet outil informatique permet de structurer en réseau des spectres de masse suivant un coefficient de corrélation calculé d'après leur similarité et de les comparer à une base de données de spectres annotés. Cette approche peut servir d'aide à l'annotation de composés.

Plus récemment des logiciels de fragmentation *in silico* ont été développés dans le but d'assister informatiquement l'annotation des spectres de masse au travers d'un algorithme capables d'attribuer un patron de fragmentation pour une molécule donnée en lien avec le spectre de masse. Les logiciels MSFinder et Sirius (Dührkop et al., 2015) ont été développées à ces fins.

Dans ce travail de thèse, le logiciel Compound Discoverer a été utilisé pour l'analyse des données du chapitre III et V tandis que le logiciel MSDial a assisté l'analyse des données des chapitres IV. MSDial intègre une base de données spectrales et un outil de fragmentation *in silico* permettant l'annotation (souvent partielle) des lipides. Outre la simplicité d'utilisation et la qualité des intégrations fournies par le logiciel, la présence d'une base de données intégrée a fortement motivé le choix de ce dernier logiciel.

3.3. CLASSIFICATION DES LIPIDES

Le terme lipide désigne plusieurs groupes de composés organiques qui sont hydrophobes ou amphiphiles. Ils sont structurellement différents et mobilisent plusieurs voies de biosynthèses. On les retrouve dans tous les règnes du vivant et chez les virus. Leurs fonctions biologiques sont multiples : les organismes les utilisent comme forme de stockage de l'énergie (triacylglycérols : TAGs) et comme composants de base des membranes cellulaires et des organites (acides gras, galactolipides, phosphoglycérolipides, sphingolipides, stérols) mais aussi comme molécules de signalisation et de défense (acide phosphatidique, phosphoinositide, sphingolipides) (Hözl and Dörmann, 2019; Hou et al., 2016; Lim et al., 2017). Les lipides les plus élémentaires sont les acides gras (**Figure 12**), ils serviront à la synthèse de nombreuses autres classes de lipides comme les glycérolipides. Ceux-ci sont constitués d'un squelette glycérol, d'une à deux chaînes acyles (acides gras estérifiés) en position *sn*-1 et/ou *sn*-2 du glycérol. Enfin, la position *sn*-3 peut être occupée par des sucres et acides aminés au travers d'une liaison éther (glycérolipides, bétaine lipides) ou phosphoester (phospholipides) (**Figure 13**).

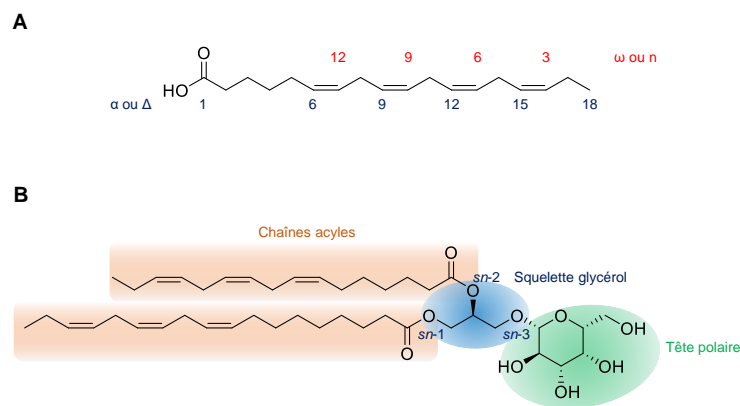
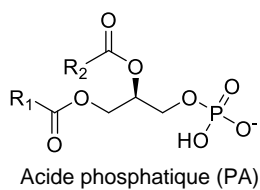
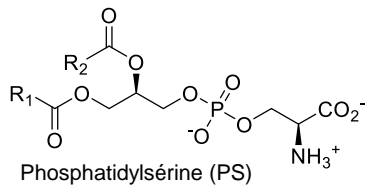
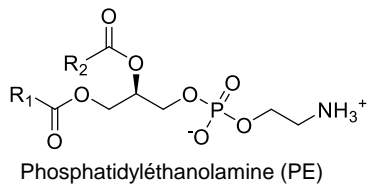
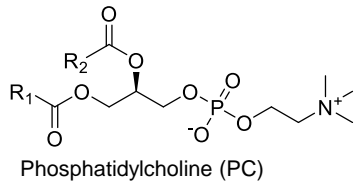
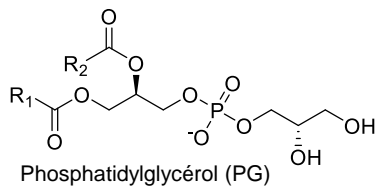
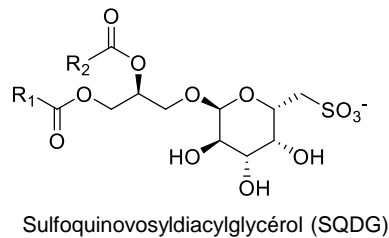
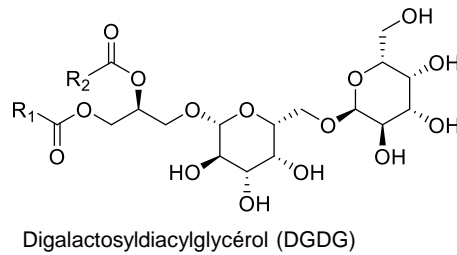
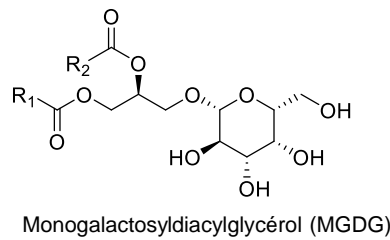


Figure 12. **A.** Acide stéaridonique ou acide (6Z, 9Z, 12Z, 15Z)-octadéca-9,12-tétraénoïque de formule brute $C_{18}H_{32}O_2$. Les atomes de carbone sont numérotés de 1 à 18 à partir de la fonction acide carboxylique. Les insaturations sont notées Δ6,9,12,15 à partir de la fonction acide carboxylique ou ω ou n à partir de l'extrémité méthyle. Cet acide gras peut-être abrégé $C_{18:4} \Delta^{6,9,12,15} \omega-3$. **B.** Structure d'un glycérolipide, ici un monogalactosyl diacylglycérol. Sur le squelette glycérol sont estérifiés l'acide gras α-linolénique ($C_{18:3} \Delta^{9,12,15}$) en position *sn*-1, l'acide hexadécatriénoïque ($C_{16:3} \Delta^{7,10,13}$) en position *sn*-2 et le galactose en position *sn*-3 au travers d'une liaison β(1-3).

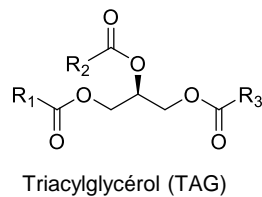
Phospholipides



Glycolipides



Glycérolipide



Bétaïne lipides

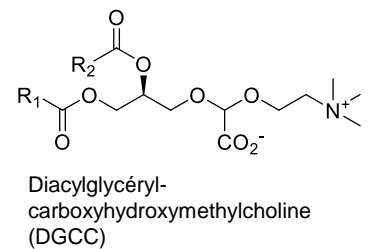
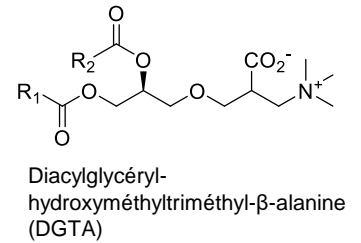
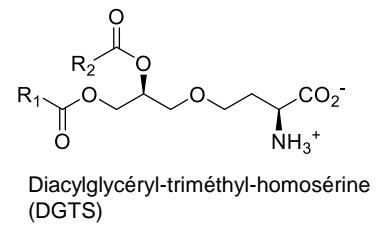


Figure 13. Différentes classes de glycérolipides végétaux. Les groupements R₁ et R₂ correspondent aux chaînes d'acide gras, une des deux peut parfois être absente, on parle alors de lyso-galactolipide.

3.3.1. LES ACIDES GRAS

La biosynthèse des acides gras (AG) est une voie primaire du métabolisme cellulaire car elle fournit la structure de base pour l'assemblage de lipides et structures lipidiques plus complexes essentiels à la croissance cellulaire (Guschina and Harwood, 2009; Guschina et al., 2014; Ohlrogge and Browse, 1995). La voie de synthèse des AG chez les plantes semble être héritée de l'ancêtre cyanobactérien car elle intervient principalement dans le chloroplaste comme chez les bactéries alors qu'elle se déroule préférentiellement dans le cytosol chez les champignons et les animaux (Ohlrogge et al., 1979; White et al., 2005). La synthèse des chaînes d'acide gras débute par l'action de l'acétyl-CoenzymeA carboxylase (ACCase), une enzyme

ATP dépendante (**Figure 14**). Bien que cette étape soit considérée comme limitante (Reverdatto et al., 1999), la surexpression du gène associé *ACCI* chez les diatomées ne modifie pas le contenu en AG (Dunahay et al., 1996). La régulation de la synthèse des AG dépend donc également d'autres facteurs et ne repose pas uniquement sur la seule modulation transcriptionnelle de l'ACCase. Le malonyl-ACP sert de substrat à l'acide gras synthétase (ou FAS : Fatty Acid Synthase) un complexe multienzymatique pour l'incorporation de deux atomes de carbone au niveau de la chaîne acyle (Acyl-ACP) à chaque cycle du processus itératif. La FAS est constituée d'enzymes dissociées, la première est la 3-cétoacyl-ACP-synthase (KAS). La KAS III assure la toute première étape de condensation d'un Acétyl-ACP avec un Malonyl-ACP. La KAS I assure la synthèse des chaînes acyles de C4 à C16, tandis que la KAS II synthétise le 18:0-ACP à partir du 16:0-ACP (Chen et al., 2011b; Li-Beisson et al., 2010). Après condensation, le substrat est successivement réduit, déshydraté puis à nouveau réduit, terminant ainsi le cycle. Les AG-thioestérase (FAT : Fatty Acid Thioesterases) produisent des AG libre, mais ceux-ci sont toxiques pour la cellule et sont rapidement exportés vers le cytoplasme en transitant par les transporteurs FAX (Fatty Acid Export) et sont à nouveau estérifiés grâce aux ligases LACS (Longue chaîne acyl-CoA synthétases) qui produisent de nouveaux des acyles-CoA (Fan et al., 2011; Shockey et al., 2002). En effet, la forme active acyl-CoA est préférée à la forme libre des AG pour être exportée vers le cytosol (Li et al., 2015; Li-Beisson et al., 2017). L'entrée des acyl gras dans le réticulum endoplasmique (RE) est réalisée par des transporteurs transmembranaires de type ABC (Kim et al., 2013). Dans le RE les acyl-gras peuvent subir de nombreuses transformations : élongation, désaturation et servent à la synthèse des lipides complexes dits extra-plastidiaux. Dans le chloroplaste les acyl-gras sont directement incorporés au diacylglycérol et servent de précurseurs à la synthèse des lipides dits plastidiaux dont la majeure partie sont des galactolipides.

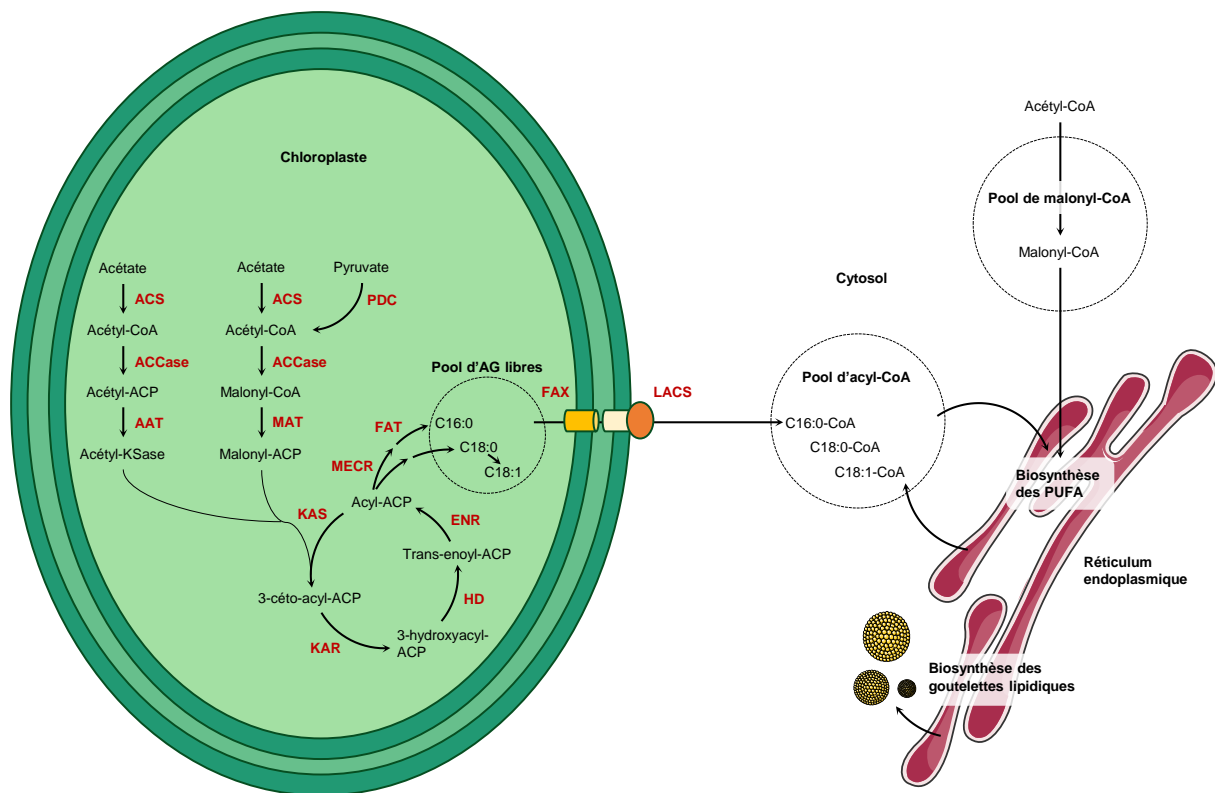


Figure 14. Schéma simplifié des voies de biosynthèse des acides gras saturés et polyinsaturés (Mühlroth et al., 2013). ACCase, acétyl-CoA carboxylase ; ENR, énoyl-ACP réductase ; FAT, acide gras-ACP thioestérase ; FAX : acide-gras export ; HD, 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase ; KAR, 3-kétoacyl-ACP réductase ; KAS, 3-kétoacyl-ACP synthase ; LACS, longue chaîne acyl-CoA synthétase ; MAT : malonyl-CoA:ACP transacylase ; MECR : mitochondrial énoyl-ACP réductase. Les substrats et de ces enzymes, les intermédiaires métaboliques et les produits finaux sont indiqués en noir : CoA, coenzyme A ; ACP, protéine transporteur de chaînes acyles ; PUFA, acides gras polyinsaturés.

3.3.2. LES GLYCEROLIPIDES

Les voies de biosynthèse des glycérolipides semblent conservées entre les plantes supérieures et les algues comme en attestent le partage des nombreux gènes homologues par les organismes de la lignée verte (Li-Beisson et al., 2015). La synthèse des glycérolipides se déroule dans le chloroplaste et le réticulum endoplasmique sous l'action d'acyl-transférases qui interviennent dans la synthèse *de novo* (acylation des précurseurs lipidiques) ou la modification des glycérolipides avec l'action conjointe de lipases et d'enzymes responsables de l'édition de la tête polaire (Boudière et al., 2014).

La synthèse *de novo* : L'enzyme glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) catalyse le transfert d'un acide gras (acyl-CoA cytosolique ou acyl-ACP chloroplastique) sur le glycérol-

3-phosphate (G3P) en position *sn*-1 (Chen et al., 2011a) (**Figure 15**). Un second acide gras est estérifié en position *sn*-2 sur l'acide lysophosphatidique (LPA) néoformé grâce à l'acide lysophosphatidique acyltransférase (LPAAT) formant ainsi de l'acide phosphatidique (PA).

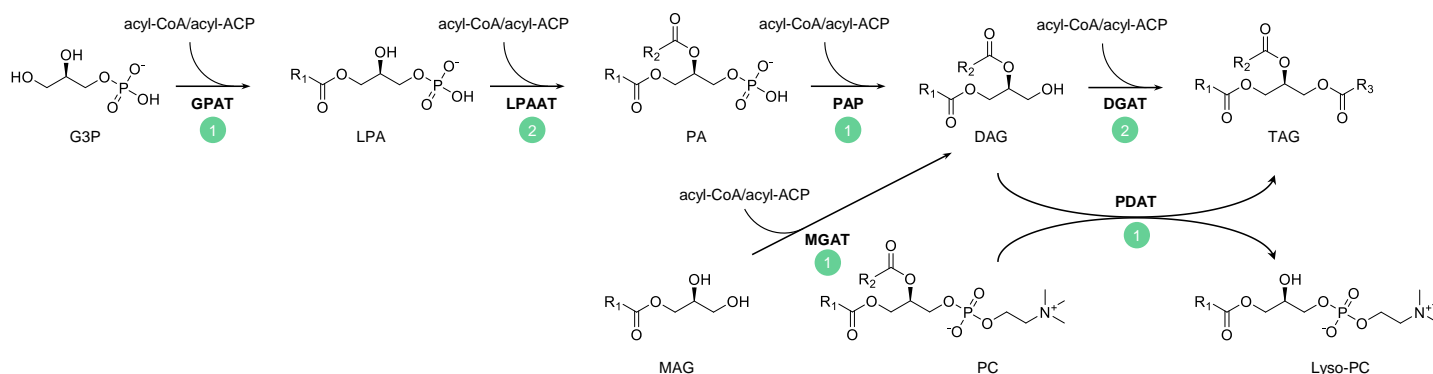


Figure 15. Biosynthèse de l'acide phosphatidique (PA) par les acyltransférases glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) et acide lysophosphatidique acyltransférase (LPAAT) qui catalysent l'estérification en position *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol-3-phosphate (G3P) (Zienkiewicz et al., 2016). Les chiffres indiquent le nombre de gènes annotés pour la protéine considérée chez *Ostreococcus*. DAG : Diacylglycérol ; DGAT : Diacylglycérol transférase ; LPA : Acide Lyso-Phosphatidique ; MAG : Monoacylglycérol ; MGAT : Monoacylglycérol transférase ; PA : Acide Phosphatidique ; PDAT : Phospholipide:DAG acyltransférase ; R₁, R₂ et R₃ : chaînes acyle ; TAG : Triacylglycérol.

Il a été démontré chez plusieurs plantes que les acyltransférases impliquées dans la synthèse de novo de PA révèlent une spécificité de substrat différente selon leur localisation cellulaire ce qui permet de déterminer le lieu de synthèse des glycérolipides (Frentzen et al., 1983).

Enzyme	Plastes	Microsome
GPAT		
acyl-accepteur	G3P	G3P
acyl-donneur	acyl-ACP	acyl-CoA
Sélectivité	18:1 ≥ 16:0, 18:0	16:0 > 18:1 > 18:0
LPAAT		
acyl-accepteur	16:0-G3P = 18:1-G3P	18:1-G3P > 16:0-G3P
acyl-donneur	acyl-ACP	acyl-ACP
Sélectivité	16:0 > 18:1, 18:0	18:1 > 16:0 > 18:0

Figure 16. Sélectivité de substrat des acyl-transférases glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) et des acide lysophosphatidique acyltransférase (LPAAT) plastidiales et microsomales dans la synthèse d'acide phosphatidique. G3P : Glycérol-3-Phosphate ; ACP : Acyl-Carrier Protein.

Dans le chloroplaste les GPAT possèdent une affinité plus forte pour les chaînes d'AG 18:1 tandis que les LPAAT estérifient préférentiellement un AG 16:0 en *sn*-2 (**Figure 16**). À

l'inverse, les GPAT microsomales estérifient préférentiellement les AG 16:0 en *sn*-1 et les LPAAT les AG 18:1 en *sn*-2. Ainsi, la spécificité de substrat des enzymes témoigne du compartiment de synthèse, les glycérolipides en C16 en position *sn*-2 sont issus de la voie de biosynthèse chloroplastique (dite voie procaryote) tandis que les glycérolipides en C18 en *sn*-2 sont synthétisés dans le RE (voie eucaryote). Il est ainsi possible de distinguer les organismes selon leur signature lipidique en *sn*-2 : les plantes dites en C18:3 *sn*-2 mobilisent la voie de biosynthèse microsomale (eucaryote) tandis que les plantes dites en C16:3 *sn*-2 mobilisent aussi bien la voie de biosynthèse microsomale (eucaryote) que chloroplastique (procaryote). En effet, les plantes dites en C18:3 *sn*-2 semblent dépourvues d'Acide Phosphatidique Phosphatase (PAP) chloroplastique coupant court à la voie de biosynthèse procaryote.

Chez *O. tauri* une GPAT, deux LPAAT et une PAP ont été annotées. L'algue peut utiliser les voies procaryote et eucaryote pour la production de glycérolipides (Misra et al., 2012; Wagner et al., 2010; Zienkiewicz et al., 2016). Par ailleurs, les gènes orthologues ont été également annotés chez *O. mediterraneus*. Le DAG et le CDP-DAG (cytidine diphosphate-DAG) respectivement produits sous l'action de la PAP et de la CDS (cytidine diphosphate-diacylglycérol synthase) vont servir de précurseurs à tous les glycérolipides dits plastidiaux (MGDG, DGDG, SQDG, PG) et extraplastidiaux (PC, PE, PI et PS) (da Costa et al., 2016).

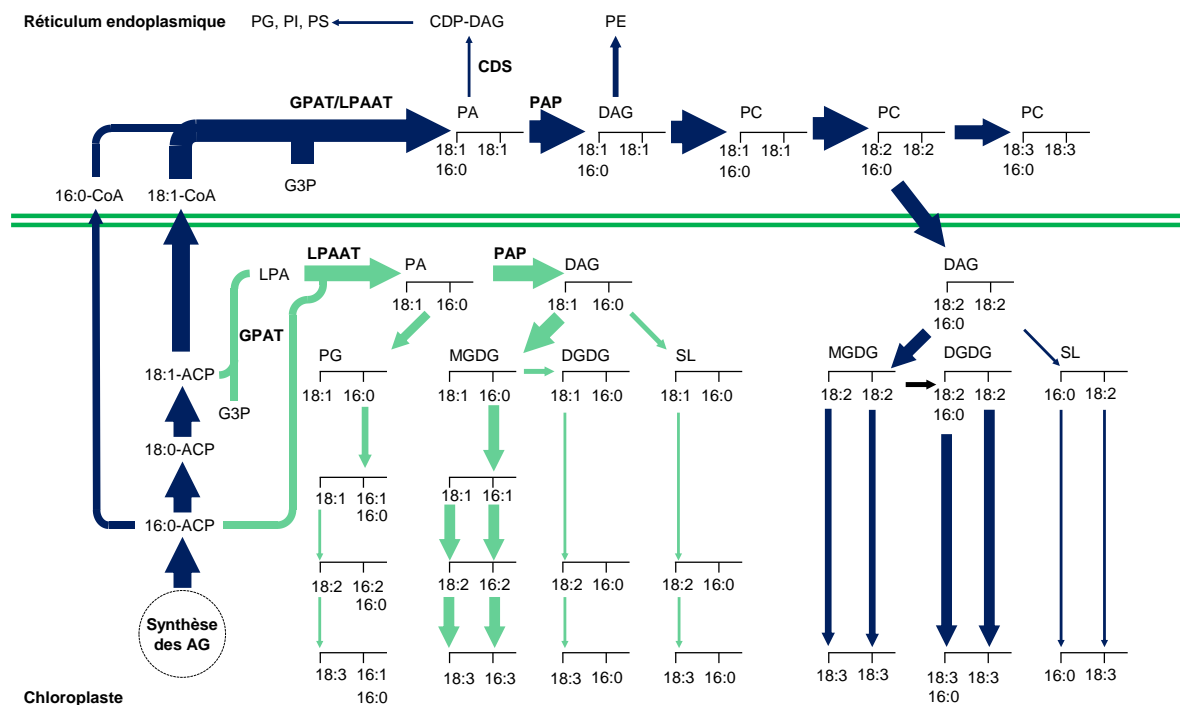


Figure 17. Voie de biosynthèse des glycérolipides chez *Arabidopsis thaliana* (Somerville and Browse, 1991). La sélectivité des Acide Lysophosphatidique Acyltransférase (LPAAT) plastidiales et microsomales et l'expression de l'Acide Phosphatidique Phosphatase (PAP) distinguent la voie procaryote (verte) de la voie eucaryote (bleue). Les glycérolipides issus de la voie procaryote et eucaryote possèdent respectivement une chaîne d'acide gras en C16 ou en C18 en position *sn*-2.

Synthèse des glycérolipides plastidiaux

Les galactolipides monogalactosyl diacylglycérol (MGDG) et digalactosyl diacylglycérol (DGDG)

Chez la plupart des microalgues les glycérolipides plastidiaux les plus abondants sont les MGDGs, pouvant représenter jusqu'à 40% de la portion lipidique (da Costa et al., 2016; Degraeve-Guilbault et al., 2017; Li-Beisson et al., 2015). En conditions normales les MGDGs sont synthétisés par une MGDG-synthase codée par *MGDI* qui assure le transfert d'un galactose sur un DAG en conformation $\beta(1-3)$ à partir d'un UDP-Galactose (Awai et al., 2001). Le MGDG sert de substrat à la DGDG synthase (codée par *DGDG1*) qui transfère un deuxième galactose (provenant d'un UDP-Galactose) cette fois-ci en conformation $\alpha(1-6)$ pour fournir du DGDG. Une galactolipide:galactolipide galactosyltransférase (GGGT codée par le gène *SFR2* : Sensitive to freezing 2) identifiée chez *A. thaliana* assure la synthèse de DGDG en conformation $\beta(1-6)$ en catalysant le transfert du galactose d'un MGDG vers un autre MGDG (Moellering et al., 2010). Les gènes homologues *MGDG2/3* et *DGDG2* sont mobilisés lors d'une carence en phosphate et constituent une voie de synthèse alternative (Moellering and Benning, 2011).

Les MGDGs et DGDGs sont d'importants lipides structuraux des membranes plastidiales et leur proportion relative peut fortement impacter la fluidité et le fonctionnement membranaire (da Costa et al., 2016). Les MGDGs présentent très souvent une structure conique, de par une tête polaire petite et des chaînes acyles fortement insaturées, qui a pour effet de déstabiliser la bicouche lipidique dans laquelle ils s'insèrent (Lee, 2000). Les DGDGs possèdent les propriétés différentes, leur forme est cylindrique et sont d'abondants constituants des bicouches lipidiques qu'ils stabilisent par leur structure. Les DGDGs peuvent également jouer un rôle structurel dans les membranes cellulaires des plantes lors des carences nutritives en phosphate où ils remplacent les phospholipides (Abida et al., 2015; Jouhet et al., 2004).

Le sulfolipide sulfoquinovosyl diacylglycérol (SQDG)

La synthèse de SQDG est assurée en plusieurs étapes dans la membrane interne du chloroplaste. L'UDP-Glucose Pyrophosphorylase (UGP3) assure le transfert d'uridine sur le Glucose-1-Phosphate afin de former de l'UDP-Glucose qui est successivement sulfaté par l'UDP-Sulfoquinovose Synthase (SQD1) (**Figure 18**). L'UDP-sulfoquinovose est transféré sur un DAG par la Sulfoquinovose transférase (SQD2) pour produire le SQDG dont l'acide sulfonique possède une conformation $\alpha(1-3)$ (Kalisch et al., 2016). Le SQDG à une forme cylindrique, ce qui lui confère des propriétés stabilisatrices comme les DGDG. Sa charge électro négative favorise les interactions avec les protéines membranaires, notamment au niveau des protéines et cofacteurs du photosystème II où il contribue au flux d'électrons (Hagio et al., 2000; Loll et al., 2007). Ce sulfolipide se substitue également au PG lors de carence nutritive tout en conservant la charge électro négative de ce dernier (Essigmann et al., 1998). La proportion de SQDG est généralement inversement corrélée à celle du PG qu'il remplace (Yu and Benning, 2003).

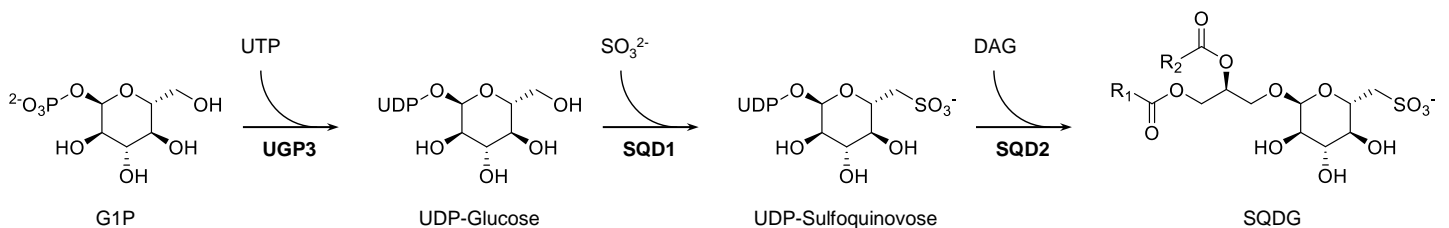


Figure 18. Voie de biosynthèse du SQDG. G1P : Glucose-1-Phosphate ; UDP : Uridine Diphosphate ; UTP : Uridine Triphosphate ; SQDG : Sulfoquinovosyl diacylglycérol.

Le phospholipide phosphatidylglycérol (PG)

La synthèse du PG débute par le CDP-DAG et l'incorporation de G3P sous l'action de la CDP-DAG:G3P phosphatidyltransferase (PGS) puis la Phosphatidylglycerophosphatase (PGPP) assure sa déphosphorylation (**Figure 19**). Si le PG est principalement retrouvé dans les membranes des thylakoïdes du chloroplaste il s'avère être un composé ubiquitaire qui constitue également les membranes extraplastidiales (RE et mitochondries) où il est également synthétisé (Khozin-Goldberg, 2016). Le rôle du PG est essentiel au niveau du thylakoïde où il contribue à maintenir le potentiel électro négatif de la membrane régulant ainsi le flux d'électron et donc la photosynthèse (Boudière et al., 2014).

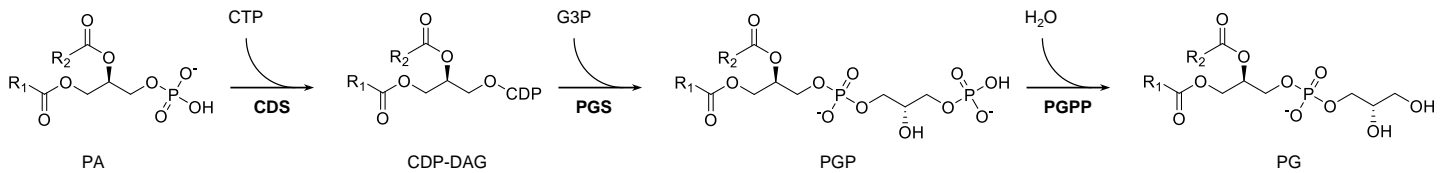


Figure 19. Voie de biosynthèse du Phosphatidylglycérol (PG). CDP-DAG : Cytidine Diphosphate-Diacylglycérol ; CDS : CDP- diacylglycerol synthase ; CTP : Cytidine Triphosphate ; G3P : Glycérol-3-Phosphate ; PA : Acide phosphatidique ; PG : Phosphatidylglycérol ; PGP : Phosphatidyl-glycérophosphate ; PGPP : Phosphatidyl-glycérophosphate Phosphatase ; PGS : CDP-DAG:G3P phosphatidyltransferase.

Synthèse des glycérolipides extra-plastidiaux

Ce sont des lipides phosphatés, parmi lesquels la PC et la PE sont des constituants majoritaires des membranes cellulaires (chez les plantes) tandis que le PI et la PS en sont les constituants minoritaires (Zheng et al., 2016). Chez les algues, les bêtaines lipides qui sont dépourvus de phosphate (l'acide aminé est relié au glycérol au travers d'une fonction éther) sont très abondants et tendent à remplacer les phospholipides dans ces membranes (Degraeve-Guilbault et al., 2017; Khozin-Goldberg, 2016; Li-Beisson et al., 2015).

La phosphatidyléthanolamine (PE)

Les plantes synthétisent la PE par décarboxylation de la sérine sous l'action de la Sérine décarboxylase (SDC) qui est une enzyme soluble spécifique de la lignée verte (Rontein et al., 2003) (**Figure 20**). L'éthanolamine est successivement phosphorylée puis cytidylée. La dernière étape de synthèse de la PE mobilise une enzyme, l'AAPT (Amino-Alcool Phosphotransférase) qui est également commune à la dernière étape de synthèse de la PC. D'ailleurs cette enzyme ne semble pas avoir de préférence pour un substrat ou un autre (Choi et al., 2000; Khozin-Goldberg, 2016).

La phosphatidylcholine (PC)

La PC est synthétisée au travers de trois voies différentes. La première est la voie de biosynthèse *de novo*, qui débute par l'incorporation de choline et est très similaire à celle de la PE puisqu'elle en partage l'AAPT (**Figure 20**). La deuxième voie est majoritaire et spécifique aux végétaux. La phosphoéthanolamine est successivement méthylée par la PEAMT (Phosphoéthanolamine Méthyltransférases) pour fournir de la phosphocholine (Eastmond et al., 2010). Enfin, la troisième voie procède de manière très similaire à la deuxième, puisqu'elle

utilise le PE et une méthyl transférase (PLMT : Phosphatidyléthanolamine N-métyltransférase) (BeGora et al., 2010). La PC est un métabolite absent chez plusieurs algues puisqu'on ne la détecte pas par analyse lipidomique et les gènes de la voie de biosynthèse sont absents chez *C. reinhardtii* et *O. tauri* (Degraeve-Guilbault et al., 2017; Sakurai et al., 2014; Sato et al., 2016).

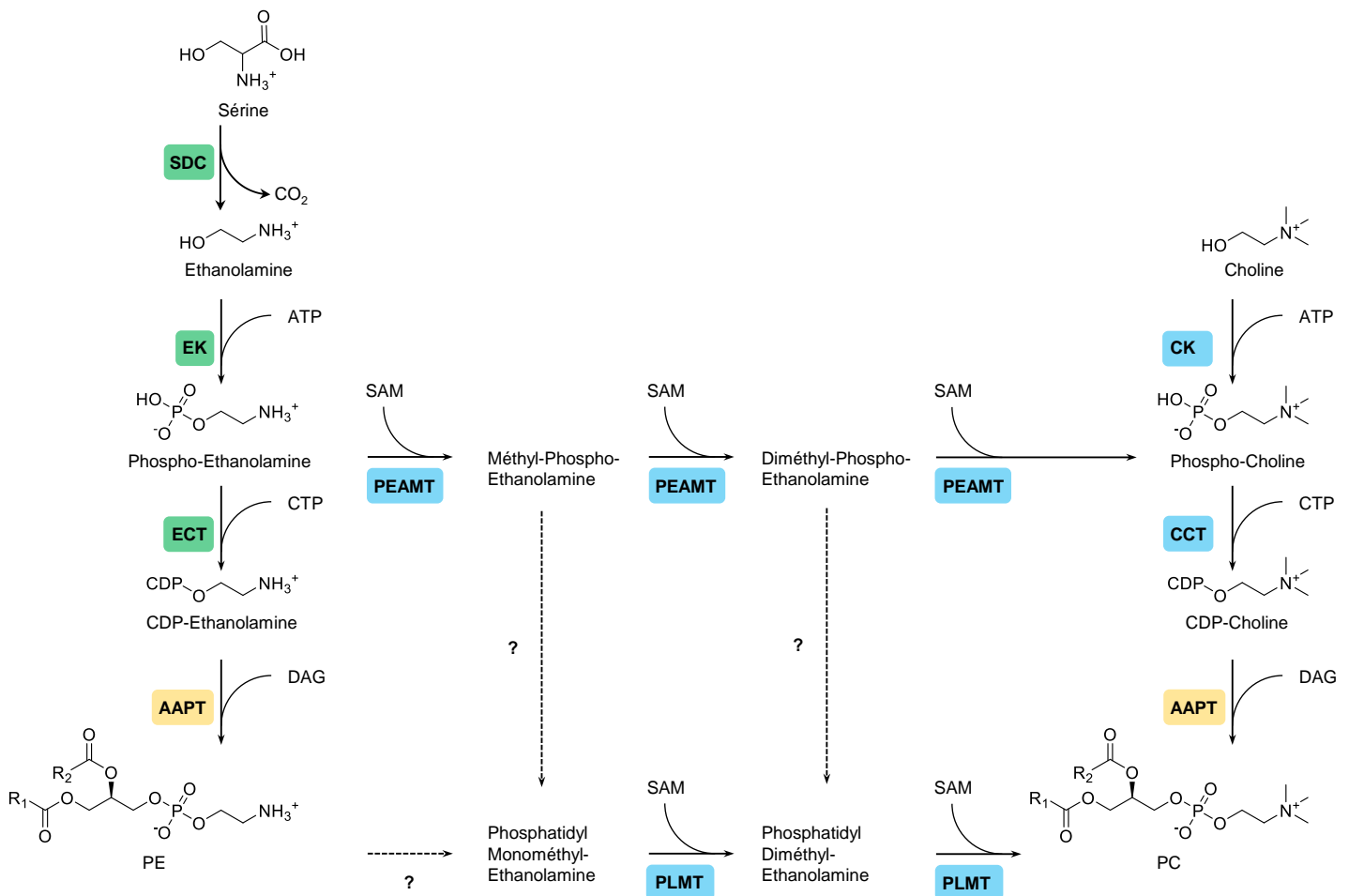


Figure 20. Voie de biosynthèse de la phosphatidyléthanolamine (PE) en vert chez *C. reinhardtii* et de la phosphatidylcholine (PC) en bleu chez *A. thaliana* (Khozin-Goldberg, 2016; Sato et al., 2016). La choline est obtenue chez les plantes par déphosphorylation de la phosphocholine ou recyclage de la tête polaire de la PC. L'éthanolamine est obtenue par décarboxylation d'une sérine par la sérine décarboxylase (SDC). La choline et de l'éthanolamine sont phosphorylées par l'action respective d'une choline kinase (CK) et d'une éthanolamine kinase (EK) (Dykes et al., 1976). A partir de la phosphocholine et de la phosphoéthanolamine, les activités séquentielles de la cholinephosphate cytidylyltransférase (CCT) et de l'éthanolaminephosphate cytidylyltransférase (ECT) forment respectivement la cytidine 5'-diphosphate (CDP) choline et CDP-éthanolamine. Celles-ci réagissent avec un 1,2-DAG pour former respectivement de la PC ou de la PE grâce à l'action de l'aminoalcool phosphotransférase (AAPT). La phosphoéthanolamine, intermédiaire de la synthèse de la PE, peut subir trois méthylations successives par des phosphoéthanolamine méthylatransférases (PEAMT) et donner

de la phosphocholine (Eastmond et al., 2010). La phosphatidylmonométhyléthanolamine (PME) peut être méthylée par des phosphatidyléthanolamine *N*-méthyltransférases (PLMT) formant de la PC par l'ajout de 2 groupements méthyles supplémentaires (BeGora et al., 2010; Keogh et al., 2009). Les intermédiaires de la première voie, catalysés par les PEAMT, pourraient également être utilisés comme substrats dans la voie catalysée par les PLMT mais les enzymes réalisant cet échange sont inconnues (Tasseva et al., 2004) (flèches pointillées).

La phosphatidylsérine (PS)

Parmi les phospholipides minoritaires, la PS est synthétisée au travers de la voie du CDP-DAG, où la sérine est incorporée par une CD-PSS (CDP-diacylglycérol:sérine *O*-phosphatidyltransférase). La PS peut être synthétisée à partir de PC ou de PE via un échange d'acide aminé sous l'action respectivement de la PSS I (phosphatidylsérine synthase I) et de la PSS II (Rani et al., 2020). La PS est un constituant minoritaire mais essentiel de la membrane de la cellule (Delhaize et al., 1999) Elle est uniquement présente au niveau de la surface interne de la membrane et sa migration au niveau de la surface externe provoque une rupture de celle-ci (O'brien et al., 1998). Les PS associées à de très longues chaînes acyles sont suspectées de jouer un rôle structural très fort, notamment dans le maintien de la courbure de la membrane plasmique.

Le phosphatidylinositol (PI)

Le PI est aussi issu de la voie du CDP-DAG et synthétisé sous l'action de la phosphatidylinositol synthase (CDIPT : CDP-diacylglycérol-inositol 3-phosphatidyltransférase) (**Figure 21**). Si le PI peut être incorporé dans la membrane plasmique il est surtout un important précurseur de nombreux Phosphoinositides, de structures plus ou moins complexes qui vont jouer un rôle majeur dans les mécanismes de signalisation (développement, attaque pathogène) au travers des boucles de phosphorylation-déphosphorylation (Heilmann, 2016).

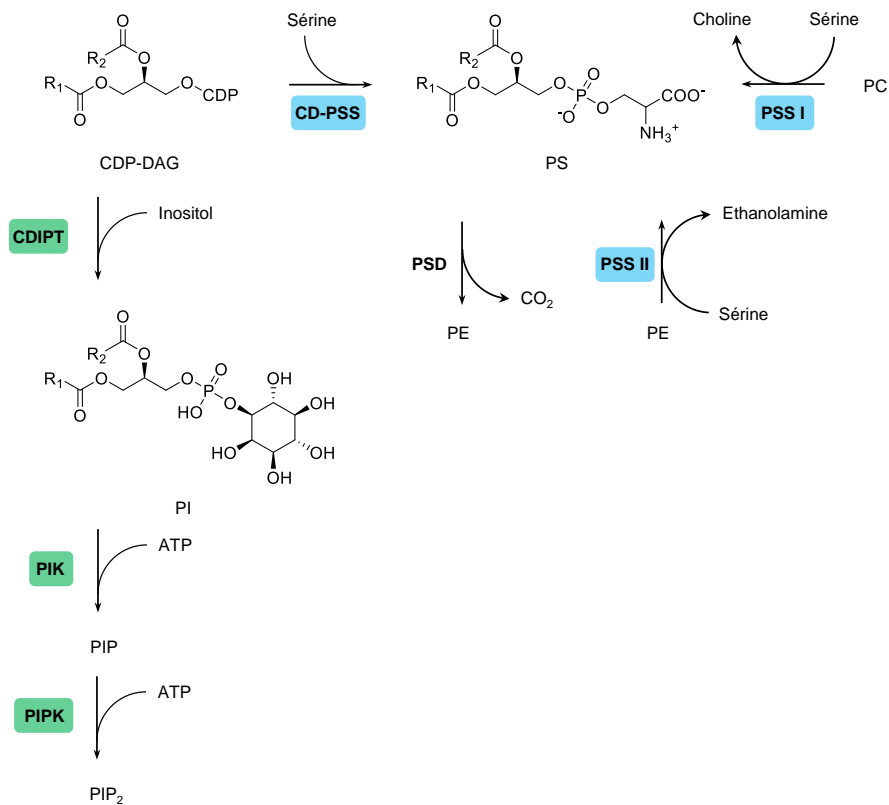


Figure 21. Voie de biosynthèse de la phosphatidylsérine (PS) en bleu chez *C. reinhardtii* et du phosphatidylinositol (PI) en vert. CDIPT : CDP-diacylglycérol-inositol 3-phosphatidyltransferase ; CD-PSS : CDP-diacylglycérol-sérine *O*-phosphatidyltransferase

Les bétaines lipides

Les bétaines lipides (BL) sont des lipides dépourvus de phosphate mais ils possèdent une certaine similarité structurale avec les autres phospholipides (PL) ; ils sont ainsi supposés avoir des fonctions similaires au sein de la membrane cellulaire. C'est lors d'expériences de carences en phosphate qu'il a été observé un remplacement des PL au profit des BL dans les membranes (Riekhof et al., 2014). Chez les algues la synthèse de DGTS se fait sous l'action de la Bétaine Lipide Synthase (codée par *BTA1*) qui assure le transfert de l'homosérine de la SAM sur un DAG puis la triméthylation de la diacylglycéryl homosérine (DGHS) (**Figure 22**) (Hofmann and Eichenberger, 1996; Riekhof et al., 2005). Le DGTA serait issu de la décarboxylation puis re-carboxylation du DGTS, expliquant la différence de position de la fonction carboxyle des deux isomères (Vogel and Eichenberger, 1992). Le DGCC serait issu d'une voie de biosynthèse visiblement différente et utiliserait la choline comme substrat d'après des expériences de radiomarquage (Kato et al., 2003). L'occurrence des BL chez les algues est

très variable. Si les DGTS semblent être la plupart du temps un marqueur des algues vertes, la découverte et l'étude lipidomique de nouvelles algues permettent de nuancer cette caractéristique. En effet, des DGTSS ont été identifiées chez l'algue jaune *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae – Straménopile) ou des DGTAs chez l'algue verte *Tetraselmis suecica* (Trebouxiophyceae – Chlorophyte) (Cañavate et al., 2016). Les DGCCs semblent être un marqueur des algues Haptophytes (Kato et al., 1996, 2003) et la microalgue *Diacronema vlkianum* est à ce jour la seule espèce à synthétiser les trois BL (Armada et al., 2013).

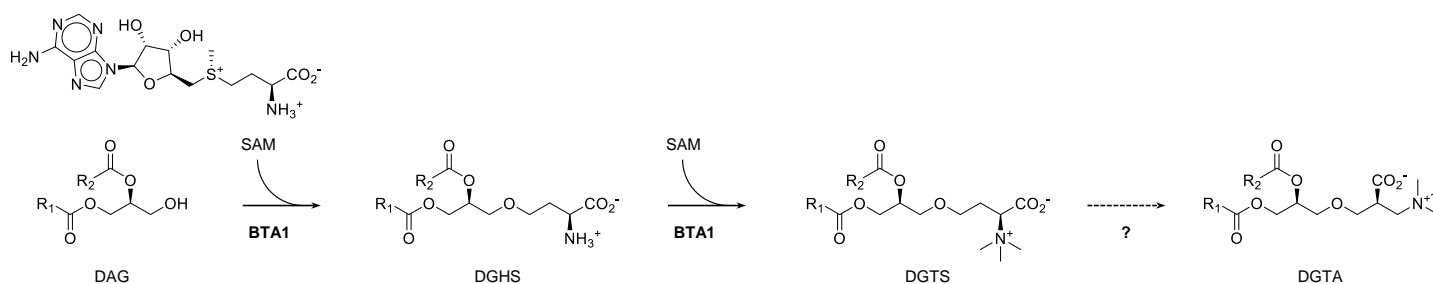


Figure 22. Voie de biosynthèse des bêtaines lipides chez les algues.

3.3.3. LES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS

Il convient de distinguer les acides gras polyinsaturés à chaîne standard (16 à 18 carbones) des acides gras polyinsaturés à chaîne longue (> 20 carbones ; LC : Long Chain) des acides gras polyinsaturés à très chaîne longue (> 26 carbones ; VLC : Very Long Chain) et tous possèdent plusieurs insaturations (PUFA : Poly-Unsaturated Fatty Acid). Les PUFAs et LC-PUFAs constituent la part la plus importante des acides gras notamment chez les microalgues (Abida et al., 2015; Degraeve-Guilbault et al., 2017; Li-Beisson et al., 2015). Chez les glycérolipides et les bêtaines lipides ils peuvent présenter jusqu'à 6 doubles liaisons selon la longueur de la chaîne. Les (LC)-PUFA sont synthétisés à partir d'acide hexa- et octadécanoïque (C16:0 et C18:0) et octadécaénoïque (C18:1) (**Figures 23, 24**) (Harwood, 2019; Mühlroth et al., 2013), qui vont subir plusieurs étapes d'élongation et de désaturation sous l'action d'élongases et de désaturases (Harwood, 2019; Shi et al., 2015). Dans le réticulum endoplasmique les élongases ont pour substrat les lipides sous forme d'acyl-CoA tandis que les désaturases ont pour substrat des acides gras. Les acyltransférases jouent de ce fait un rôle essentiel dans la synthèse des (LC)-PUFA. L'activité des désaturases et des acyltransférases déterminerait l'efficacité des voies de biosynthèse (Domergue et al., 2003; Ruiz-Lopez et al.,

2012; Zulu et al., 2018). Dans le chloroplaste, les désaturases agissent directement sur les MGDGs et DGDGs.

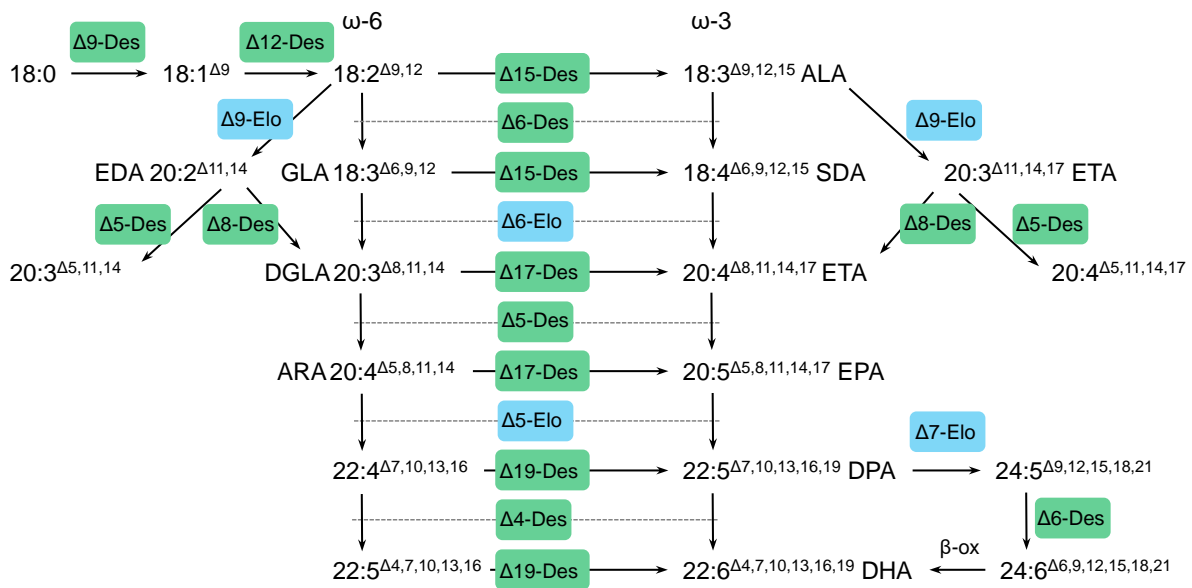


Figure 23. Voies de biosynthèse des (LC)-PUFA à partir de l'acide octadécanoïque (C18:0) dans le réticulum endoplasmique (Chilton et al., 2014). ALA : acide α -linoléinique ; ARA : acide arachidonique ; Des : Désaturase ; DGLA : Dihomo- γ -linolenic acid ; DHA : acide docosahexaénoïque ; DPA : acide docosapentaénoïque ; EDA : acide éicosadiénoïque ; Elo : Élongase ; EPA : acide éicosapentaénoïque ; ETA : acide éicosatétraénoïque ; SDA : acide stéaridonique.

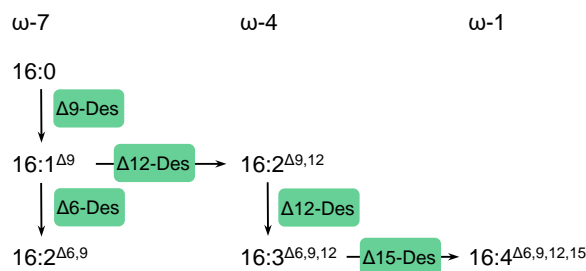


Figure 24. Voies de biosynthèse des VLC-PUFA à partir de l'acide hexadécanoïque (C16:0).

Les AG désaturases

les AG désaturase ou FAD (Fatty Acid Desaturase) sont des oxydoréductase qui catalysent la formation de doubles liaisons sur les chaînes acyles par déshydrogénation (Li et al., 2016). Ces enzymes mobilisent les cytochrome b5 dans le RE et des ferrédoxines dans le

chloroplaste comme donneurs d'électrons (Sperling et al., 2003). La plupart des désaturases sont membranaires, tandis que quelques désaturases solubles ont été identifiées, comme la stéaroyl-ACP-désaturase (SAD) localisée dans le stroma des chloroplastes (Shanklin and Somerville, 1991). Les désaturases se distinguent par (i) leur spécificité de substrat, c'est-à-dire le type de chaîne et le porteur de chaîne, (ii) la régiosélectivité (position de la double liaison sur la chaîne : Δ) et (iii) la stéréospécificité (position *sn-1/sn-2* du squelette glycérol et orientation *cis/trans* de la double liaison) (Gagné et al., 2009). La majorité des désaturases génèrent des doubles liaisons orientées *cis* sur les chaînes acyles mais leur spécificité de substrat et leur régiosélectivité sont très variables. Ainsi, on répertorie 4 types de désaturases (Gostinčar et al., 2010; Li et al., 2016) : (i) les **'first' désaturases ($\Delta 9$)** catalysant la formation de la première double liaison sur la chaîne acyle, elles forment les AG monoinsaturés. (ii) les **'méthyle' ou 'omega' désaturases ($\Delta 12/\omega-6$, $\Delta 13/\omega-3$, $\Delta 15/\omega-3$, $\Delta 17/\omega-3$ et $\Delta 19/\omega-3$)** catalysant la formation d'une double liaison entre une insaturation préexistante et l'extrémité méthyle de la chaîne acyle. Ces enzymes assurent la transition d'un acyl-gras $\omega-6$ vers $\omega-3$. (iii) les **'front-end' désaturases ($\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 8$)** catalysent la formation d'une double liaison entre une insaturation préexistante et l'extrémité carboxyle de la chaîne acyle. Enfin, (iv) les **sphingolipides désaturases ($\Delta 4$, $\Delta 8$)** catalysent l'insertion d'une double liaison sur la chaîne acyle des sphingolipides.

3.3.4. OXYDATION DES CHAINES ACYLES

L'oxydation des chaînes acyles des glycérolipides ou des acides gras libres est un phénomène courant produisant une large diversité de métabolites parmi lesquels les plus connus sont les oxylipines (Genva et al., 2019; Mosblech et al., 2009). Les oxylipines sont des métabolites ubiquitaires que l'on retrouve dans toutes les divisions du vivant : animaux, champignons, plantes et bactéries où ils jouent un rôle essentiel dans le développement et les voies de défenses contre les pathogènes (Wasternack and Feussner, 2018). Les oxylipines sont synthétisés à partir de PUFA au travers de trois voies métaboliques : (i) la voie des cytochromes P450, (ii) la voie des lipoxygénases (LOX) et enfin, (iii) celle des dioxygénases (DOX) (Andreou et al., 2009) (**Figure 25**)

La synthèse des oxylipines débute sous l'action des lipases qui hydrolysent les chaînes d'AG des lipides membranaires (MGDG, DGDG, PG). L'acide linoléique (C18:2 $\Delta^{9,12}$), l'acide

α -linoléique (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$) ou encore l'acide hexadécatriénoïque (C16:3 $\Delta^{6,9,12}$) sont les substrats préférentiels (Griffiths, 2015; Wang et al., 2018).

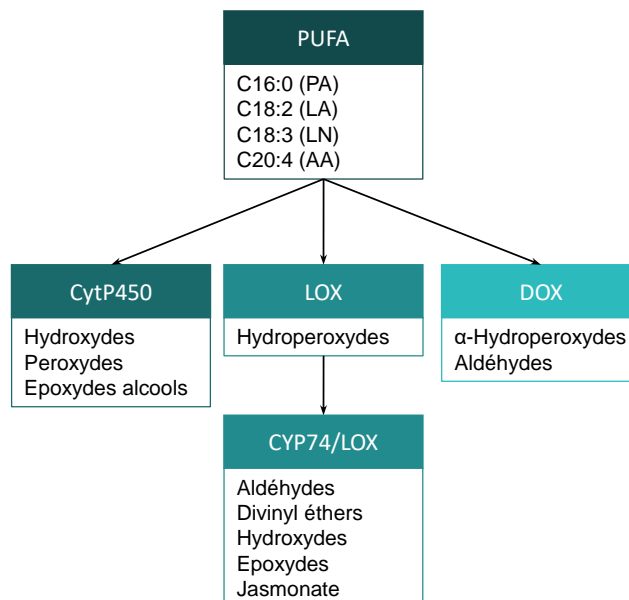


Figure 25. Voies de biosynthèse des oxylipines chez les plantes (Andreou et al., 2009; Blée, 2002; Genva et al., 2019). PA : acide palmitique, LA : acide linoléique, LN : acide linoléique, AA : acide arachidonique, EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA : acide docosahexaénoïque. Les hydroperoxydes peuvent également servir de substrat à des cytochromes P450 de type CYP74 parmi lesquelles : la divinyl-éther synthétase (divinyl-éther), l'époxy alcool synthétase (époxy-alcools), l'hydroperoxyde lyase (aldéhydes) et l'allène oxyde synthétase (jasmonate).

Les cytochromes P450 (CYP450)

Ce sont des hémoprotéines (ici une protéine avec un hème contenant du fer comme cofacteur) qui catalysent des réactions d'oxydoréductions présentes dans la plupart du vivant. Les CYP450 constituent une famille multigénique chez les plantes qui représente environ 1% des gènes ; on dénombre ainsi 245 gènes appartenant à cette famille chez *A. thaliana* (Mizutani, 2012). La séquence héminique et celle de l'hélice I impliquée dans la liaison avec le dioxygène sont fortement conservées, le reste de la séquence pouvant diverger fortement selon l'espèce (Bak et al., 2011). Selon leur fonction les CYP450 ont été classés en quatre catégories. Ainsi, les deux premières catégories regroupent les CYP450 impliquées dans le métabolisme primaire, la synthèse des stéroïdes végétaux et des caroténoïdes (pigments photosynthétiques essentiels) (Morikawa et al., 2006; Tian et al., 2004). La catégorie trois regroupe les CYP450 jouant un

rôle dans la synthèse des phytohormones (gibbérélines, brassinostéroïdes, strigolactones), dont les oxygénases qui appartiennent à la sous-famille des CYP74 (Bishop and Yokota, 2001; Bouwmeester et al., 2003; Helliwell et al., 1998; Nelson et al., 2004; Song et al., 1993). La divinyl-éther synthétase (DES), l'époxy alcool synthétase (EAS), l'hydroperoxyde lyase (HPL), l'allène oxyde synthétase (AOS), l'allène oxyde cyclase (AOC) sont des CYP74, une famille de monooxygénases atypiques qui ne requièrent pas d'oxygène moléculaire ni de NAD(P)H comme cofacteur (Genva et al., 2019), elles utilisent l'hydroperoxyde à la fois comme substrat et comme donneur d'oxygène (**Figure 26**). La synthèse d'acide jasmonique (JA) mobilise l'ensemble de ces enzymes CYP74 dans le chloroplaste, suivi de plusieurs cycles de β -oxydation de l'acide 12-oxo phytodiénoïque (OPDA) dans le peroxyosome avant que le JA ne soit libéré dans le cytosol (**Figure 27**). Enfin, la quatrième catégories regroupe les CYP450 impliquées dans la synthèse de métabolites secondaires comme les saponines (triterpènes glycosylés), le taxol ou certains alcaloïdes (Mizutani, 2012).

Parmi les différents cytochromes P450 on distingue celles catalysant des réactions de type ω -hydroxylation et 'in-chain' hydroxylation qui correspondent respectivement à l'ajout d'une fonction hydroxyle au niveau méthyle de la chaîne d'AG ou en son milieu, tandis que CYP450 époxydases assurent la formation d'un pont époxy en milieu de chaîne d'AG (Pinot and Beisson, 2011). La nature du substrat et la régiosélectivité des CYPs dépend de la séquence et de la structure de la protéine et de son hème. Pour une revue de la classification des CYP450 et de leurs fonctions voir (Mizutani, 2012; Pinot and Beisson, 2011; Xu et al., 2015).

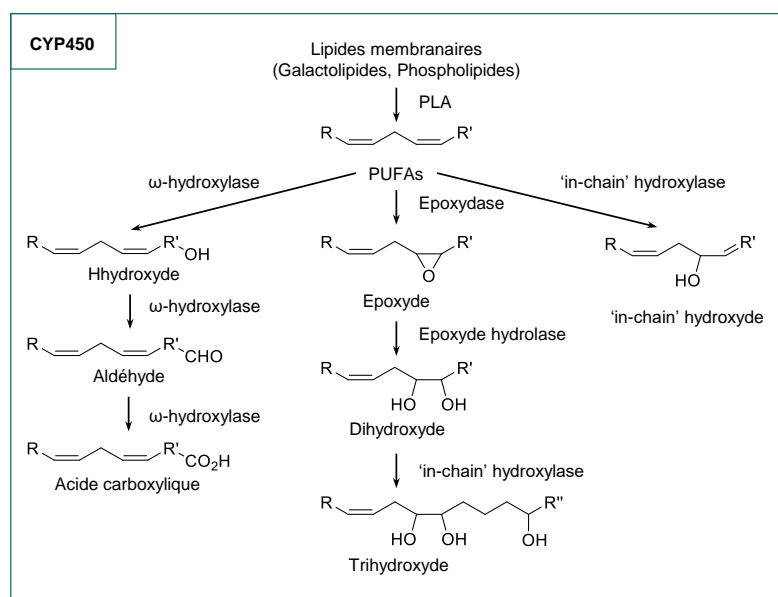


Figure 26. Voie de biosynthèse des oxylipines dérivées de l'action des enzymes de la famille des cytochromes P450. PUFAs : Poly Unsaturated Fatty Acids (Acides gras polyinsaturés).

Les lipoxygénases

Les LOXs sont des enzymes non-héminiques ferriques qui catalysent la formation de fonctions hydroperoxyde sur des PUFAs avec une structure de type (2E,4Z)-pentadiène et une régio- et stéréospécificité particulière (**Figure 27**). Ainsi les 9-LOX et 13-LOX catalysent l'oxydation des AG respectivement en position $\Delta 9$ ou $\Delta 13$ (Griffiths, 2015; Porta and Rocha-Sosa, 2002; Schneider et al., 2007). Les LOXs sont des enzymes monomériques de 94 à 104 kDa chez les plantes avec un domaine N-terminal de type PLAT (Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-toxin) (Newcomer and Brash, 2015). Ce motif indique que les enzymes peuvent interagir avec les membranes cellulaires (Brash, 1999). Le domaine C-terminal contient le site catalytique héminique et demeure très conservé au sein du vivant (Oliw, 2002). Les gènes codant pour les LOXs sont présents sous forme de familles multigéniques chez la plupart des plantes. On dénombre six membres chez *Arabidopsis* et au moins 14 chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Liavonchanka and Feussner, 2006), tandis qu'un seul gène est annoté chez *O. mediterraneus* (Ostme02g00890). Chez *A. thaliana* les six isoformes de LOXs montrent une localisation cellulaire différente. D'ailleurs, ces enzymes fournissent des *pools* de PUFAs oxydés différents, qui alimentent des voies métaboliques différentes et induisent ainsi des effets physiologiques différents (Genva et al., 2019; Viswanath et al., 2020).

Les dioxygénases

Les α -DOXs sont également des oxydoréductases non-héminiques à fer, qui ont la particularité d'incorporer le dioxygène sans libération d' H_2O au niveau du carbone α des PUFAs (**Figure 27**) (Abu-Omar et al., 2005). Il a été montré chez *A. thaliana*, une induction du gène α -DOX1 lors de la réponse hypersensible (HR). La transcription du gène α -DOX1 à ce moment-là est dépendante de l'acide salicylique mais aussi de l'ion superoxyde (O_2^-) et du NO. D'après cette même étude l'induction de la dioxygénase se fait selon une voie de signalisation différente de celle contrôlant les LOXs, contrôlées par la voie de l'acide jasmonique.

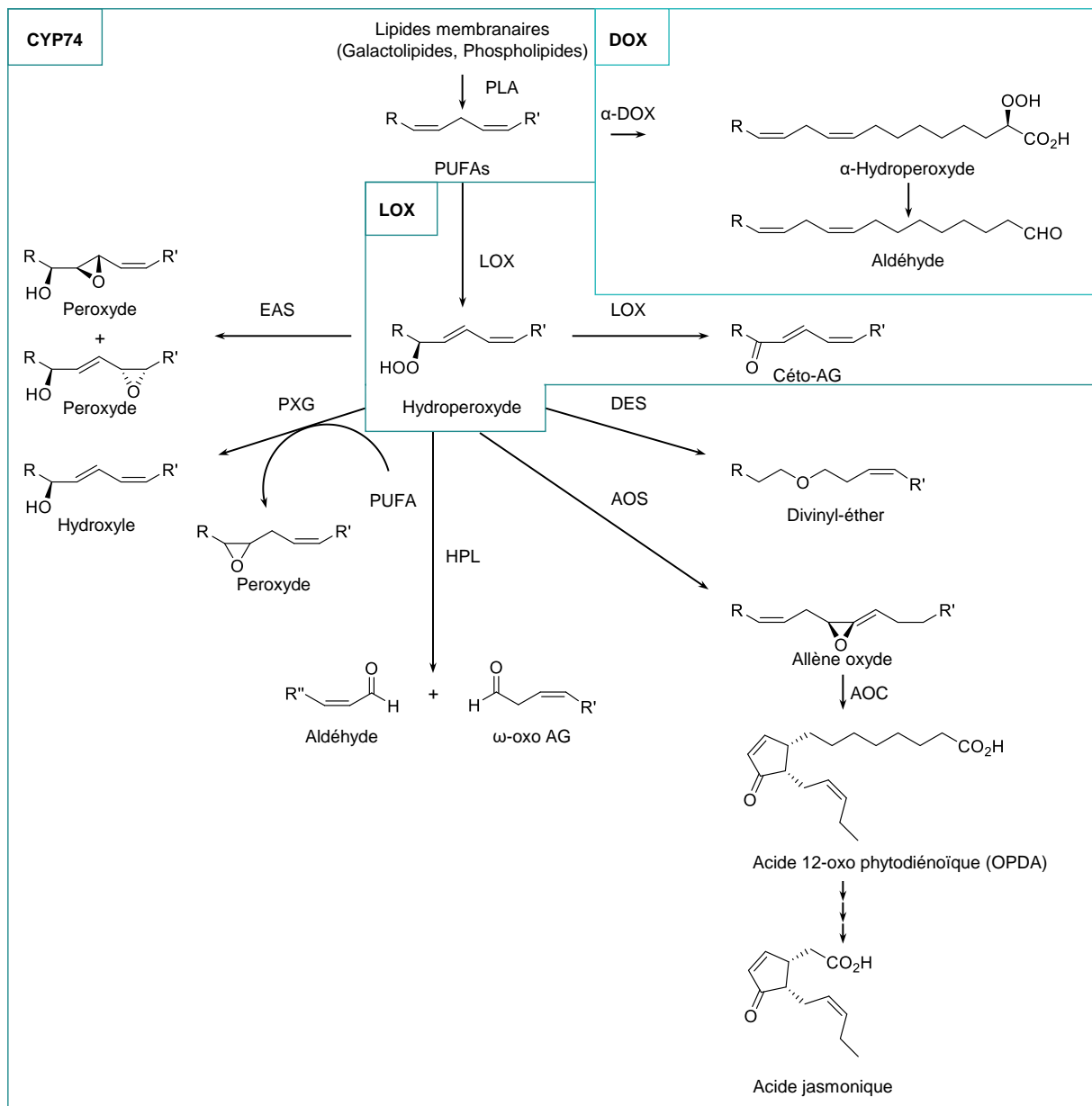


Figure 27. Voie de biosynthèse des oxylipines dérivées de l'action des enzymes de la famille des cytochromes CYP74. AES : époxy alcool synthétase ; AG : acide gras ; AOC : allène oxyde cyclase ; AOS : allène oxyde synthétase ; DES : divinyl-éther synthétase ; HPL : hydroperoxyde lyase ; PUFAs : poly unsaturated fatty acids (acides gras polyinsaturés) ; PXG : peroxygénase (Mosblech et al., 2009).

Oxylipines estérifiées

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la synthèse d'oxylipines estérifiées sous forme de galacto- ou phospholipides. La première suggère que les oxylipines sont produites à partir d'AG libres (libérés sous l'action des phospholipases) puis ré-estérifié produisant ainsi des lipides complexes. La seconde suppose que les chaînes acyle des lipides

complexes sont directement oxydées sans étape intermédiaire (Buseman et al., 2006; Chechetkin et al., 2009, 2013; Stelmach et al., 2001). En effet, *in vivo* les LOXs qui catalysent la première étape d'oxydation des lipides semblent n'utiliser comme substrat que des AG libres (Babenko et al., 2017) mais *in vitro*, des LOXs semblent capables d'oxyder les chaînes acyles de galacto- et de phospholipides. Ainsi, plusieurs MGDGs peuvent être le substrat de LOX1 chez le soja (Feussner et al., 1995; Meyer et al., 2013; Nakashima et al., 2011). Les galactolipides dont les chaînes acyles sont oxydées et qui sont les plus étudiés sont les arabidopsides (**Figure 28**).

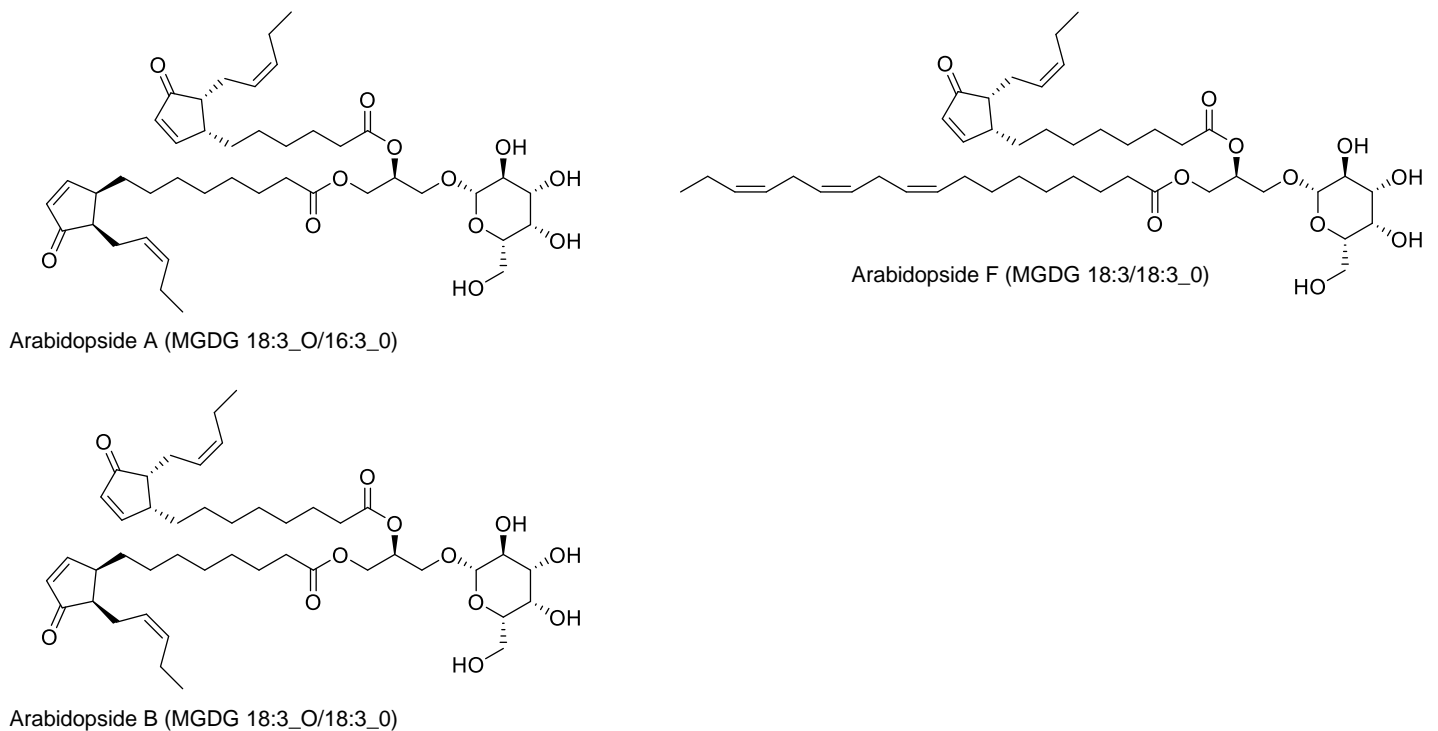


Figure 28. Structures de quelques arabidopsides (galactolipides oxydés).

Les arabidopsides sont des galactolipides oxydés (MGDG, DGDG) vraisemblablement produits directement par oxydation des lipides membranaires. Il a été démontré chez *A. thaliana* que des plants incubés dans de l'eau marqué à l' O^{18} n'aboutissait pas à la formation d'arabidopsides marquées à l' O^{18} , indiquant que les AG estérifiés n'ont pas été hydrolysés, oxydés puis ré-estérifiés (Nilsson et al., 2012). Chez *A. thaliana* l'enzyme LOX2 semble fortement impliquées dans la synthèse des arabidopsides car les mutant *lox2-1* sont fortement déficients en arabidopsides A, B et C (Nilsson et al., 2016; Zoeller et al., 2012). D'autre part, l'augmentation de l'expression en HPL diminue l'accumulation d'arabidopsides chez

A. thaliana, suggérant une compétition des enzymes HPL et AOS pour les AG estérifiés hydroperoxydés (Nilsson et al., 2016). En effet, un mutant d'*A. thaliana* qui n'exprime pas d'HPL fonctionnelle produit de plus grande quantités d'arabidopsides (Duan et al., 2005). Pour résumer, la synthèse d'arabidopsides mobilise les trois enzymes clés LOX, AOS et AOC tandis que l'expression d'HPL orienterait vers la synthèse de galactolipides à chaînes oxydées courtes (Figure 29).

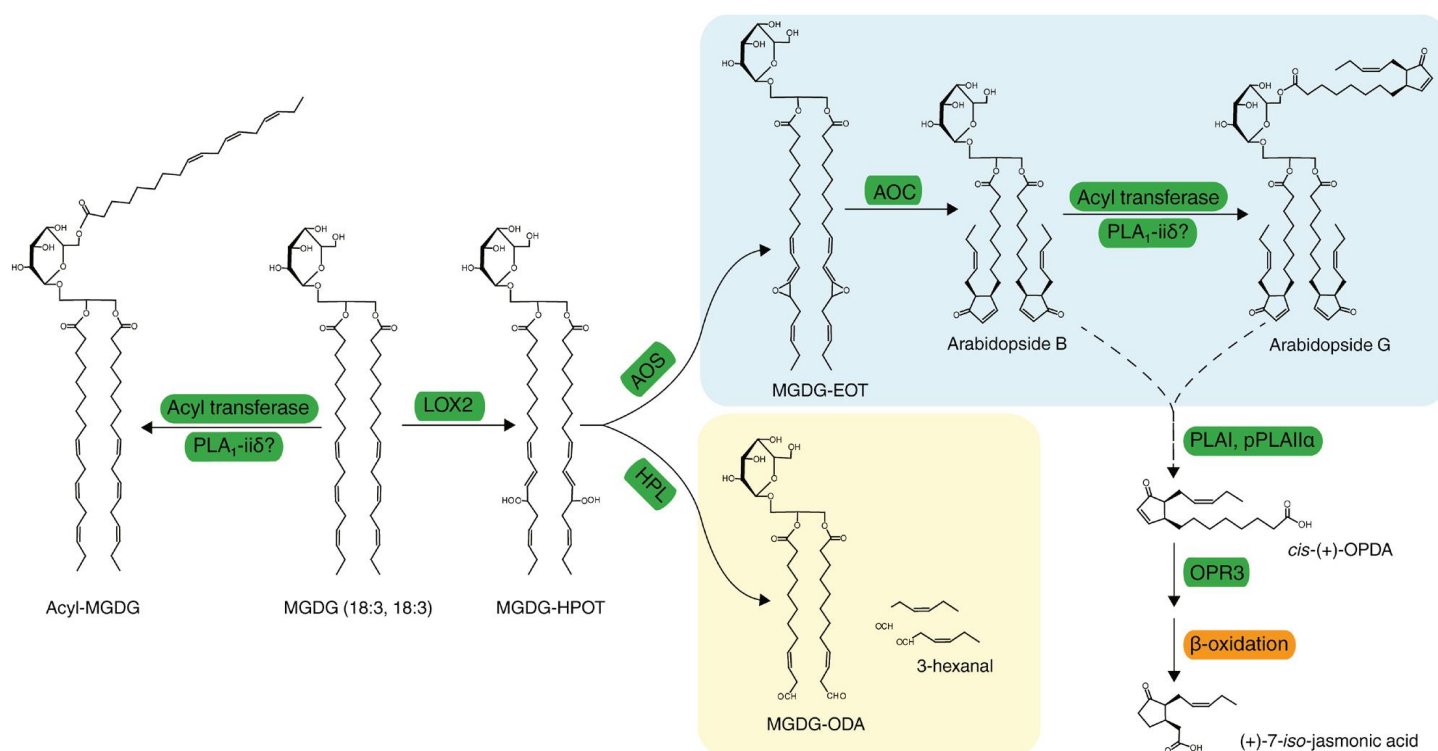


Figure 29. Modèle proposé pour la biosynthèse de l'arabidopside. La lipoxygénase 2 (LOX2) catalyse l'oxydation des chaînes d'acides gras du monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) pour former l'acide MGDG-13(S)-hydroperoxy-octadécatriénoïque (MGDG-HPOT). Le MGDG-HPOT est transformé en arabidopsides *via* l'acide MGDG-12,13-époxy octadécatriénoïque (MGDG-EOT) sous l'action de l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC) (en bleu). Le MGDG-HPOT peut être également partiellement clivé par l'hydroperoxyde lyase (HPL) pour former l'acide MGDG-12-oxo-dodécénoïque (MGDG-ODA) et les aldéhydes en C6 correspondants (en jaune). PLA1, pPLAII α et PLA1-ii δ sont des phospholipases.

Les galactolipides oxydés sont des constituants des membranes des thylakoïdes où ils sont retrouvés en grande quantité (Böttcher and Weiler, 2007) et l'AOS et l'AOC sont localisées au niveau de ces membranes (Wasternack and Hause, 2013). Par ailleurs, on ne sait pas si les galactolipides oxydés sont présents dans d'autres compartiments cellulaires et peuvent transiter

d'un compartiment à un autre. Les galactolipides (non oxydés) peuvent transiter des membranes chloroplastiques à d'autres membranes plastidiales, notamment lors de conditions de croissance limitantes en phosphate (Jouhet et al., 2004).

Bien que le rôle précis des galactolipides oxydés n'ait pas été élucidé, ils sont associés au développement et aux mécanismes de défense chez les plantes face à des stress biotiques (herbivorie, pathogènes) et abiotiques (froid) (Buseman et al., 2006; Chechetkin et al., 2009). En raison de leur structure et de leur polarité particulière, les arabidopsides pourraient modifier l'organisation des lipides et les propriétés de la membrane plasmique telles que la fluidité et la perméabilité. Un large éventail de protéines sont présentes dans la membrane plasmique, dont certaines sont impliquées dans des fonctions de signalisation. Une modification de l'environnement lipidique de ces protéines pourrait altérer leurs activités et ainsi influencer les voies de signalisation, peut-être celles qui sont impliquées dans les mécanismes de défense. Il est aussi supposé que les oxylipines estérifiées agissent comme une réserve et sont hydrolysées lorsque l'organisme a besoin d'oxylipines (Dave and Graham, 2012). Chez *A. thaliana*, deux phospholipases pPLAII α et AtPLAI capables d'hydrolyser le (dn)OPDA ont été identifiées (Yang et al., 2012). Le (dn)OPDA peut alors servir de substrat à la synthèse de JA, hormone essentielle au développement et à la défense chez les plantes (Wasternack and Feussner, 2018).

3.4. BIOSYNTHESE DES SPHINGOLIPIDES

La synthèse *de novo* des sphingolipides est initiée au niveau de la face cytosolique du RE où la sérine palmitoyl-CoA transférase (SPT) assure la condensation du palmitoyl-CoA et d'une sérine pour former la 3-cétosphinganine (**Figure 30**) (Takahashi et al., 2009). Cette molécule est immédiatement réduite par une cétosphinganine réductase (KSR) en sphinganine qui constitue la longue chaîne de base (LCB : *long chain base*) des futurs sphingolipides. Les gènes codant pour la SPT sont présents dans la plupart du vivant et particulièrement conservés chez les eucaryotes (Lynch and Dunn, 2004). Les expériences de *knockout* menées sur ces gènes conduisent systématiquement à une dégénérescence et la mort de l'organisme, cela met en avant l'importance des LCBs et de la voie des sphingolipides dans le maintien de la viabilité des cellules (Chen et al., 2006). La LCB est toujours constituée de 18 atomes de carbone mais peut être hydroxylée ou insaturée. Les groupements hydroxyle se trouvent en position C1 et C3 (d18:0 et d18:1, d = dihydroxyle) tandis que le groupement hydroxyle en C4 (t18:0, t = trihydroxyle) intervient plus tard dans la voie de biosynthèse sous l'action d'une

C4-hydroxylase. Les voies de la C4-hydroxylase et de la Δ^4 désaturase sont respectivement prédominantes chez les plantes et les animaux (Michaelson et al., 2016). Les LCBs sont acylées sous l'action de céramides synthases (CS). Chez *A. thaliana* les gènes *LOH1* et *LOH3* codent pour des CS qui combinent préférentiellement la LCB t18:0 avec des acyles-CoA à (très) longue chaîne ((V)LCFA > 20C) tandis que le gène *LOH2* code pour une CS qui a davantage d'affinité pour la LCB d18:0 et les chaînes acyles en C18. Chez *A. thaliana* la longueur des chaînes acyles peut varier de 16 à 26 carbones (Michaelson et al., 2016). L'altération de l'expression des gènes *LOH1/3* conduit à une déplétion en LCB t18:0 ce qui a de graves effets développementaux (arrêt de la division et de l'expansion des cellules) (Chen et al., 2008). La spécificité de substrat en acyle-CoA des CS est un mécanisme encore mal décrit chez les plantes. Chez l'humain, ce sont des variations dans la séquence d'acides aminés du domaine Tram-Lag-CLN8 (TLC) des six CS caractérisées qui détermine la spécificité en acyles-CoA (Tidhar et al., 2018). La distribution des CS est tissu-spécifique, ce qui explique l'occurrence de sphingolipides avec différentes chaînes acyle selon le compartiment cellulaire.

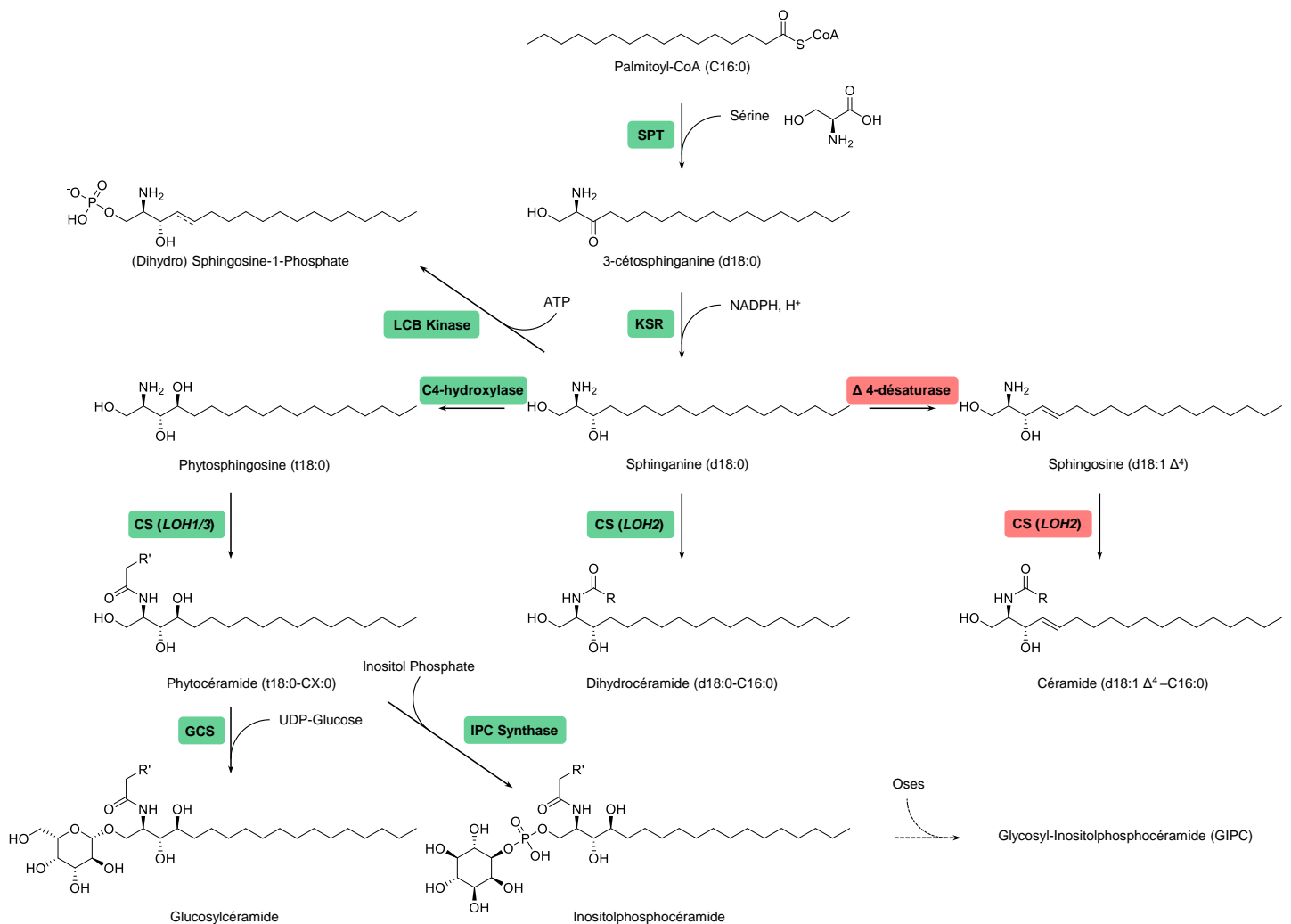


Figure 30. Voie de biosynthèse des sphingolipides. CS : céramide synthase ; GCS : glucosylcéramide synthase ; IPC : inositolphosphocéramide ; KSR : cétosphinganine réductase ;

Les LCBs peuvent être successivement désaturées en position $\Delta 4$ et $\Delta 8$. Des mutants *des4* (Désaturase $\Delta 4$) chez *A. thaliana* révèlent une faible production de sphingolipides avec une chaîne acyle en C16 indiquant que cette désaturase catalyserait préférentiellement la synthèse de ces sphingolipides (Michaelson et al., 2009). A *contrario* la désaturation en position $\Delta 8$ de la LCB semble aspécifique puisqu'elle est retrouvée chez la plupart des sphingolipides quelle que soit la longueur de la chaîne acyle (Sperling et al., 2005). D'ailleurs, les $\Delta 8$ -LCBs sont caractéristiques des plantes et retrouvés seulement chez quelques champignons (Ternes et al., 2006).

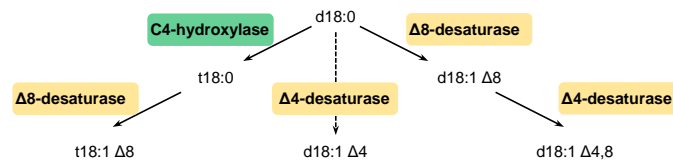


Figure 31. Voie d'édition des longues chaînes de base (LCB) des sphingolipides.

Les différents céramides (phyto- dihydro- céramides) sont exportés vers l'appareil de Golgi où ils acquièrent différentes têtes polaires formant ainsi les différentes classes de sphingolipides complexes que l'on retrouve chez les plantes : les glycosyl inositol-phosphorylcéramides (GIPCs) et divers glucosylcéramides (GlcCERs) que l'on retrouve ensuite principalement à la surface des membranes cellulaires (Tafesse and Holthuis, 2010). Les GIPCs et GlcCERs constituent 64 % et 34 % des sphingolipides totaux chez *A. thaliana* alors que le pool de céramide ne représente pas plus de 2% (Markham et al., 2006). Le rôle structural des GIPCs et GlcCERs est primordial au niveau des membranes plasmiques, où ces composés sont spécifiquement associés aux stérols avec lesquels ils forment les radeaux lipidiques (*lipid rafts*) à la surface de celles-ci (**Figure 32**) (Borner et al., 2005). Les GIPCs sont généralement constitués d'une LCB trihydroxylée et d'une très longue chaîne acyle hydroxylée au niveau du carbone α (hVLCFA : 2-hydroxylated very long chain fatty acid). C'est au travers de ce groupement hydroxyle que le GIPC interagit avec les stérols. De nombreux oses, comme l'arabinose, le fucose, le galactose ou encore le mannose, sont estérifiés au niveau de la fonction hydroxyle de la LCB au travers de liaisons phosphoesters, formant ainsi les différentes classes de GIPCs (Gronnier et al., 2016). La voie de biosynthèse des GIPCs

est très peu décrite, seules les enzymes catalysant les deux premières étapes de la voie ont été caractérisées : l'IPCS (Inositol-Phosphoryl Céramides Synthase) et l'IPUT1 (IPC Glucuronyl Transférase) (**Figure 33**) (Rennie et al., 2014; Wang et al., 2008).

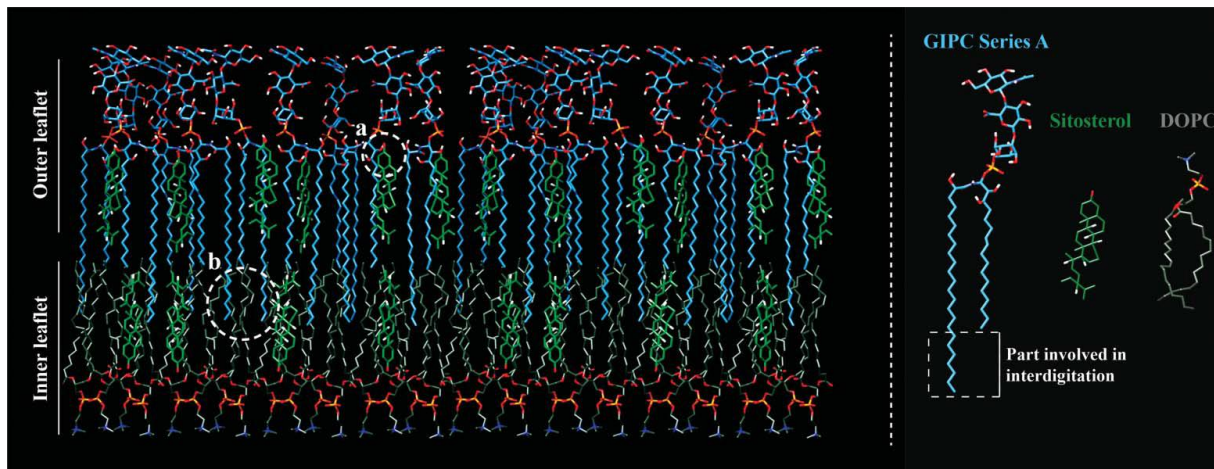


Figure 32. Modèle d'organisation des lipides de la membrane plasmique végétale. Les interactions spécifiques entre les groupes hydroxyles des GIPC et les sitostérols sont montrées en (a), l'interdigitation entre les VLCFA des GIPC dans la notice externe et l'AF de la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC : dioleoyl PC) dans la notice interne est montrée en (b).

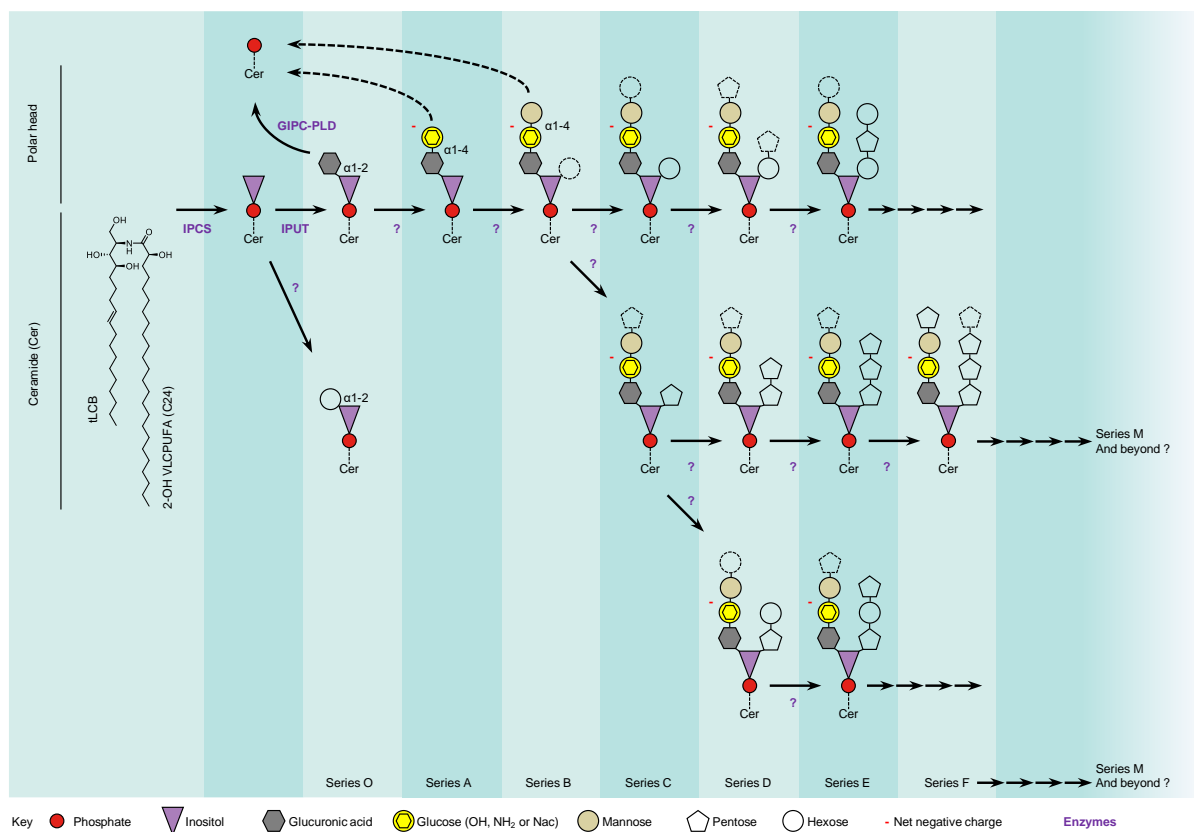


Figure 33. Biosynthèse des glycosyl inositol-phosphorylcéramides (GIPC) végétaux (Gronnier et al., 2016). Les glycosphingolipides végétaux sont synthétisés pas à pas sous l'action de glycosyltransférases.

Les enzymes sont représentés en violet, un grand nombre d'entre elles restent encore non caractérisées. GIPC-PLD : GIPC-phospholipase D ; IPCS : inositol-phosphorylcéramide synthase ; IPUT : l'inositolphosphoryl-céramide glucuronosyl-transférase.

L'étude des radeaux lipidiques dans le cadre des interactions hôte-virus tend à confirmer l'implication de ces structures membranaires dans l'entrée du virus dans la cellule. Chez les virus enveloppés Semliki Forest Virus (SFV) et Sindbis Virus (SIN) l'infection requiert la présence absolue de sphingolipides glycosylés et de cholestérol formant les fameux radeaux lipidiques dans la membrane hôte (Kielian and Helenius, 1984; Kielian et al., 2002). Des expériences *in vivo* de déplétion de lignées cellulaires hôtes en glycosphingolipides et/ou cholestérol montrent une diminution drastique de l'entrée et de la production de particules virales chez SFV et SIN (Phalen and Kielian, 1991). Cette caractéristique ne semble toutefois pas universelle mais plutôt souche spécifique puisque le cycle infectieux du virus VSV (Vesicular Stomatitis Virus) ne montre pas de dépendance aux glycosphingolipides et au cholestérol lors d'expérience de carence similaires (Lu and Kielian, 2000).

Les récepteurs hôtes à de nombreux virus enveloppés sont localisés au niveau des radeaux lipidiques comme le récepteur GLUT-1 (glucose transporteur 1) du rétrovirus HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus Type I) (Maeda et al., 2015), le récepteur FR α (Folate Receptor α) du virus Ebola (Simmons et al., 2003), le récepteur CR2 de l'hépatite B (Takahashi and Suzuki, 2011) ou encore le récepteur CD46 de l'Herpès Virus 6 (HHV-6) (Tang et al., 2008). Le même constat est fait pour de nombreux virus non enveloppés comme le Simian Virus 40 et l'Echovirus de Type 1 qui s'ancrent au niveau de récepteurs hôtes situés dans des radeaux lipidiques (Chazal and Gerlier, 2003). Les rôles des glycosphingolipides lors de ces interactions sont vraisemblablement multiples : ils permettraient une interaction ionique faible entre la membrane virale et l'hôte, favorisant l'adhésion des particules et le déplacement de celles-ci vers les récepteurs (Lorizate and Krausslich, 2011). Dans le cas de virus enveloppés, ceux-ci sont dirigés vers des récepteurs et sites où la membrane libère la particule virale (*uncoating*). Ce mécanisme a été étudié chez le Coxsackie B Virus (Picornavirus à ARN responsable de méningites et myocardites) qui reconnaît le récepteur DAF (Decay-Accelerating Factor), une protéine ancrée dans la membrane au travers de GPIC au niveau des radeaux lipidiques (Shieh and Bergelson, 2002). La reconnaissance du récepteur DAF par le virus induit une cascade de signalisation (activation de la tyrosine kinase ABL puis de la GTPase Rac) provoquant une réorganisation de la membrane hôte et facilitant l'accès du virus au récepteur hôte CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor). Cette dernière étape provoque une dépolarisation de la

membrane virale et l'accès de la capsid à de nouveaux récepteurs membranaires permettant au virus de continuer son cycle infectieux (Coyne and Bergelson, 2006). Ces multiples exemples démontrent l'importance des GIPCs membranaires, notamment liés aux stérols, dans le succès ou l'échec du cycle infectieux viral. Toutefois, à ce jour, aucun auteur ne semble avoir étudié *in vivo* le rôle des modifications des GIPCs dans l'acquisition de la résistance virale même si cette piste peut être (hypothétiquement) utilisée dans l'immunité de l'hôte.

D'une autre part, les céramides et leurs dérivés phosphorylés et hydroxylés sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires de signalisation ou encore la mort cellulaire programmée (PCD : Programmed Cell Death) lors d'attaques de pathogènes (Moeder and Yoshioka, 2008). La Céramide Kinase ACD5 (Accelerated Cell Death) et la protéine de transfert de sphingosine ACD11 ont été identifiées comme impliquée dans la PCD. Chez *A. thaliana* la perte de fonction d'ACD5 par mutation induit l'accumulation parallèle de céramide et de ROS suivi de la mort cellulaire (Bi et al., 2014). Une mutation inactivant l'IPCS provoque l'accumulation de céramides et l'induction rapide de la mort cellulaire (Wang et al., 2008). La phosphorylation des céramides semble être un moyen pour la plante de se prémunir de la PCD et d'orienter ceux-ci vers d'autres compartiments et d'autres fonctions en conditions normales. Toutefois, lors d'interactions avec des pathogènes le gène *LOH2* est surexprimé chez *A. thaliana* conduisant à l'accumulation de céramides de type d18:0-C16:0 puis d'acide salicylique (SA) et de l'expression constitutive des gènes de la réponse hypersensible (HR) conduisant à la PCD (Luttgeharm et al., 2015).

3.5. BIOSYNTHESE DES TERPENES

Les terpènes d'origine végétale sont formés à partir de l'assemblage d'unités à cinq carbones ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène (unité isoprénique), à savoir le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) et d'isopentényl-pyrophosphate (IPP) (Banerjee and Sharkey, 2014). Le nombre d'unités isopréniques définit les différentes classes de terpènes : monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterterpènes (C25), triterpènes (C30) et tétraterpènes (C40). Les stérols sont des triterpènes (C30) qui dérivent de la condensations de deux unités sesquiterpéniques (C15) (Devarenne et al., 2002).

Biosynthèse des stérols végétaux

La synthèse des précurseurs des stérols végétaux peut emprunter la voie cytosolique du mévalonate (MVA) ou chloroplastique du méthylérythritol phosphate (MEP) (Lombard and

Moreira, 2011), mais chez *Ostreococcus* et les autres Prasinophytes seule la voie du MEP est codée (Rohmer, 2010). Cette voie est initiée par la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) qui catalyse la condensation de pyruvate et de glycéraldéhyde-3-phosphate issus de la glycolyse et aboutit sous l'action de différentes enzymes à la synthèse de DMAPP et d'IPP (**Figure 35**). Ces unités précurseurs sont ensuite successivement condensées pour donner le géranyle-pyrophosphate (GPP, C10) et le farnésyl-pyrophosphate (FPP, C15) sous l'action de la farnésyl-pyrophosphate synthase (FPPS). Le FPP seul est le précurseur d'hormones végétales comme l'acide abscissique tandis que deux unités de FPP condensées sous l'action de la squalène synthase (SQS) donnent le squalène, le précurseur des stérols végétaux (phytostérols). La condensation de FPP et d'IPP aboutit au géranyle-géranyle-pyrophosphate (GGPP, C20), le précurseur des hormones végétales de la famille des gibbérellines ou de la chaîne phytyle des chlorophylles tandis que deux unités de GPP condensées vont donner le tétraterpène phytoène (C40), précurseur des caroténoïdes. L'ensemble de ces composés sont des précurseurs de nombreuses voies de biosynthèses qui peuvent alors entrer en compétition pour leur substrat (Fray et al., 1995).

Les triterpènes (C30) constituent une vaste classe de composés qui dérivent tous initialement de la même voie de biosynthèse mais se distinguent par la structure de leur noyau : les stérols sont des triterpènes tétracycliques qui se différencient des triterpènes pentacycliques à noyaux lupane, oléane ou encore ursane. Ces différents noyaux servent de base et sont modifiés sous l'action successive de nombreuses enzymes. Ainsi, pas moins de 250 stérols ont pu être identifiés chez les plantes (Valitova et al., 2016).

Les stérols sont une classe de composés quasi ubiquitaire du vivant mais très variable entre les plantes, les champignons ou encore les animaux. Ainsi, deux grandes voies sont observées selon la classe d'organisme : la cyclisation du squalène-2,3-époxyde conduit respectivement à la voie du lanostérol chez les animaux et les champignons et la voie cycloarténol chez les plantes (Darnet and Schaller, 2019). Les stérols caractéristiques sont le cholestérol chez les animaux, l'ergostérol chez les champignons tandis que les plantes synthétisent une vaste diversité de stérols : le sitostérol, le stigmastérol et le campésterol sont les plus abondants (**Figure 34**) (Heftmann, 1971). Chez les plantes, les enzymes clés qui interviennent après la cyclisation du squalène-2,3-époxyde sont la stérol 24-méthyltransférase (SMT1 et SMT2) et la stérol 22-désaturase (CYP710A) catalysant la production de 24-méthyl cycloarténol (SMT1), de 24-éthylidénolophénol (SMT2) et de sitostérol (CYP710A) (Diener et al., 2000). Des mutants *SMT1* et *CYP710A* (sous-expression des gènes) chez *A. thaliana*

montrent des problèmes développementaux et reproductifs tandis que la surexpression de *CYP710A* confère à la plante une résistance accrue aux pathogènes bactériens (Wang et al., 2012). Les mécanismes de résistance associés demeurent pour autant inconnus. L'activité de SMT2 oriente quant à elle le flux métabolique vers la synthèse de 24-méthyl stérols (campéstérols) et de brassinostéroïdes ou bien de 24-éthyl stérols (sistostérols, stigmastérols). La balance entre 24-méthyl et 24-éthyl stérols est assurée par SMT2. Cette balance est essentielle pour le développement cellulaire. Chez *A. thaliana*, une déplétion en campéstérol et brassinostérol conduit à une diminution du développement (diminution de l'élongation cellulaire) (Schaller, 2003). La balance entre les différents stérols régule la fluidité et la perméabilité membranaire. Ces composés interagissent avec la chaîne acyle des phospho- et sphingolipides qui constituent la bicouche lipidique et limitent ainsi sa mobilité selon le type de stérols (Hartmann, 1998). Le cholestérol a le pouvoir stabilisant le plus fort, suivi par le campestérol, le sitostérol et le stigmastérol (Hodzic et al., 2008). Toutefois, ce sont davantage les 24-éthyl stérols (sitostérol, stigmastérol) qui seront utilisés pour la rigidification de la membrane lors d'attaques de pathogènes, d'herbivores ou encore lors de stress abiotiques (Griebel and Zeier, 2010; Rogowska and Szakiel, 2020; Senthil-Kumar et al., 2013). Les stérols associés aux sphingolipides (GIPCs) contribuent à la formation des radeaux lipidiques : ce sont des structures membranaires de très petite taille (10-200 nm), très dynamiques par le nombre d'enzymes et de complexes de signalisation qu'ils rassemblent (Laloi et al., 2007; Simon-Plas et al., 2011). La teneur en stérols va indirectement influencer l'activité enzymatique, la transduction des signaux ou encore les interactions protéines-protéines et protéines-lipides qui se déroulent au niveau de ces structures (Schaller, 2003; Valitova et al., 2016). Des changements dans la teneur en stérols dans les radeaux lipidiques se traduit très souvent par des effets indésirables sur le développement et la germination chez les plantes (Kim et al., 2010) ou encore par de multiples maladies chez l'humain (pour revue (Puri et al., 1999; Vance, 2006)) L'équilibre du ratio 24-méthyl et 24-éthyl stérols sert au bon fonctionnement des membranes et la mise en place d'une réponse immunitaire lors d'attaque pathogène.

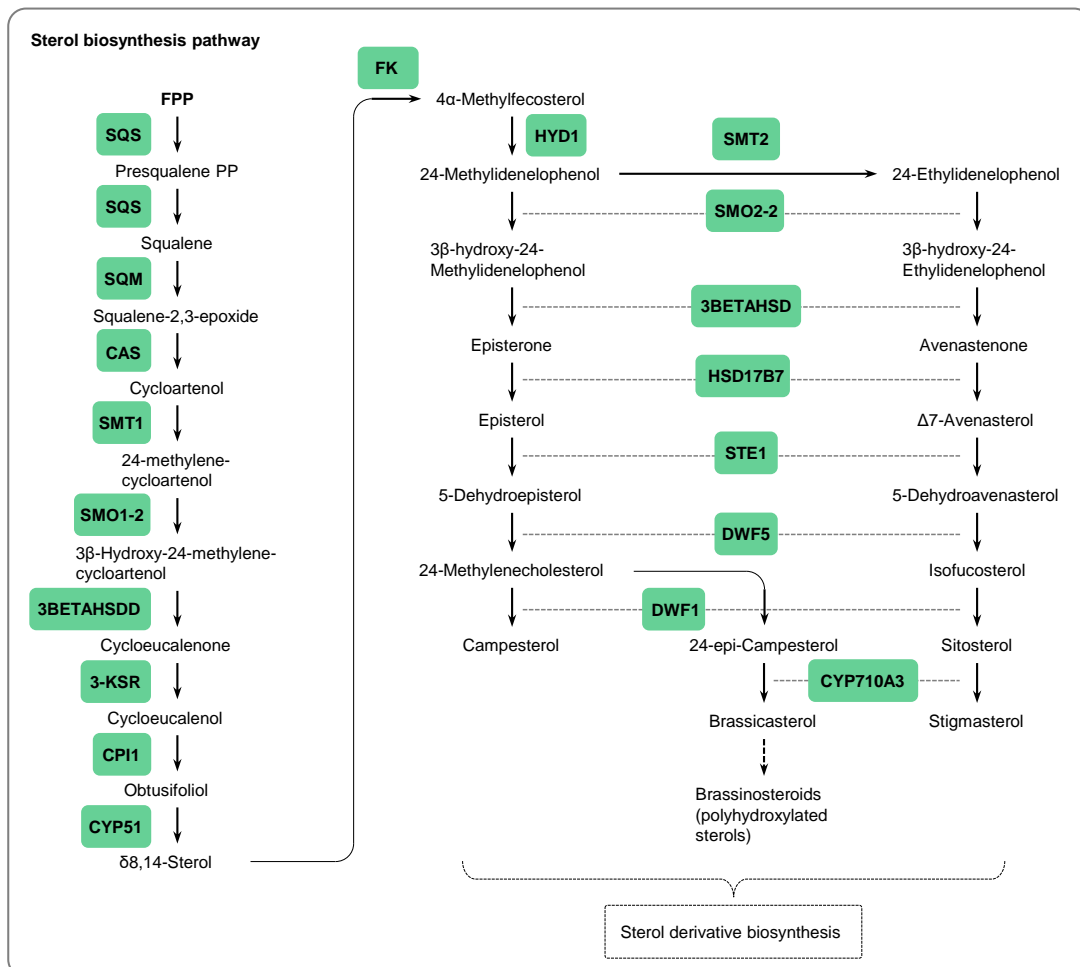
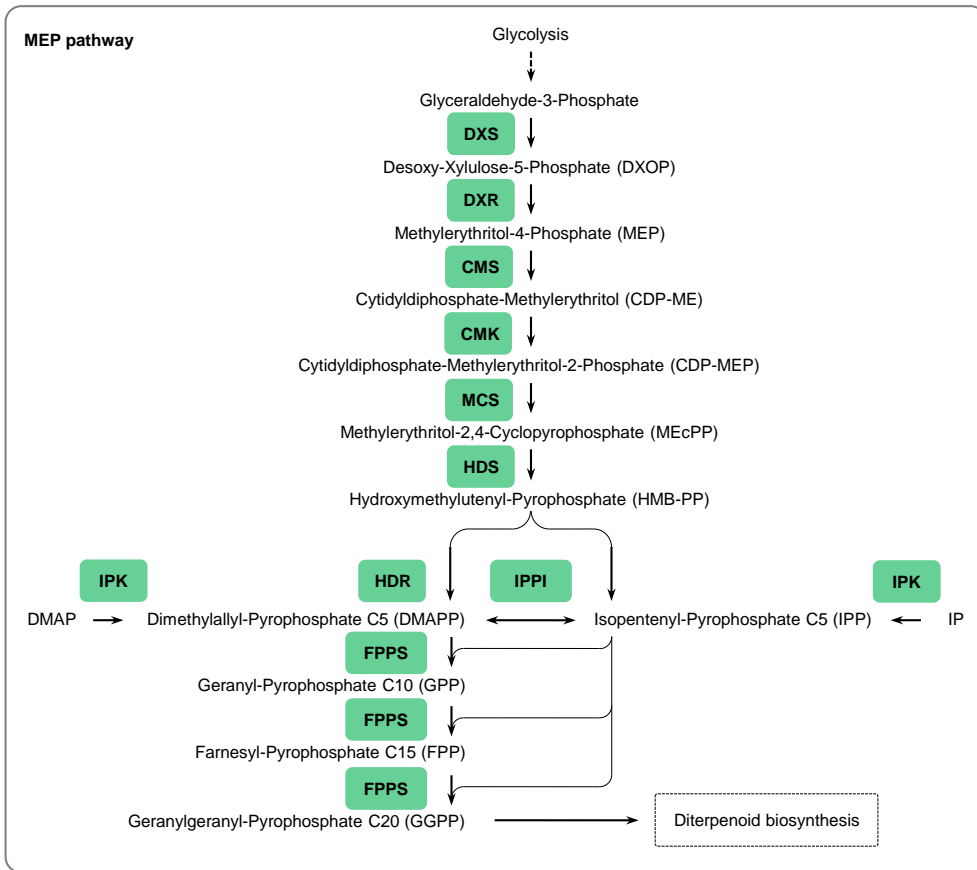


Figure 35. Voies de biosynthèse du méthylérythritol-4-phosphate (MEP) et des stérols végétaux (phytostérols). Le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) et l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) sont les unités isopréniques de base servant à la synthèse, entre autres, des composés diterpéniques et triterpéniques (stérols). 3BETAHSD : 3 β -hydroxysteroid-4 α -carboxylate 3-dehydrogenase ; CAS : cycloartenol synthase ; CMK : CDP-ME kinase ; CMS : MEP cytidylyltransférase ; CPI : cycloeucaleanol cycloisomérase ; CYP51 : stérol 14 α -déméthylase ; CYP710A : stérol 22-désaturase ; DWF1 : Δ 24-sterol réductase ; DWF5 : 7-déhydrocholestérol réductase ; DXR : DXP réductoisomérase ; DXS : DOXP synthase ; FK : Δ 14-stérol réductase ; FPPS : farnésyl pyrophosphate synthase ; HDS : HMB-PP synthase ; HDR : HMB-PP réductase ; HSD17B7 : 3 β -hydroxystéroïde 3-déhydrogénase ; HYD : cholestérol Δ -isomérase ; IPK : IP kinase ; IPP1 : IPP isomérase ; 3-KSR : 3 β -hydroxystéroïde 3-déhydrogénase ; MCS : MECCP synthase ; SQM : squalène monooxygénase ; SQS : squalène synthase ; SMO1-2 : 4,4-diméthylstérol C-4 α -méthyl-monooxygénase ; SMO2-2 : 4 α -monométhylstérol monooxygénase ; SMT1 : stérol 24-C-méthyltransférase ; SMT2 : 24-méthylstérol C-méthyltransférase ; STE : Δ 7-stérol 5-désaturase.

3.6. APPROCHE INTEGRATIVE : LA METABOLOMIQUE DANS L'ETUDE DU SYSTEME MICROALGUE-VIRUS.

Cela fait maintenant une dizaine d'années que le système *E. huxleyi* et ses virus associés EhVs (Haptophyte-coccolithovirus) est étudié au travers de l'outil métabolomique. En effet, le génome du virus EhV86 a révélé contenir la plupart gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des sphingolipides (Wilson, 2005; Wilson et al., 2002). L'analyse métabolomique du virus révèle alors la présence de glycosphingolipides (GSLs) dans la membrane (Vardi et al., 2009). Les auteurs purifient ces GSLs qu'ils introduisent dans le milieu de cultures saines d'*E. huxleyi* ; ils observent alors l'induction de biomarqueurs de la mort cellulaire chez le phytoplancton (réduction de l'activité du photosystème II, induction de l'activité caspase). Les GSLs sont alors considérés comme des biomarqueurs de l'infection virale et sont suspectés de jouer un rôle dans la virulence du coccolithovirus. Ces observations sont par la suite corroborées par des expériences *in-situ* lors du suivi de la terminaison d'une efflorescence algale par le virus (Vardi et al., 2012). Une analyse lipidomique de suivi d'infection révèle une forte modification du profil lipidique de l'hôte (Fulton et al., 2014). Une baisse de la teneur en glycolipides de type mono-galactosyl diacylglycerol (MGDG), di-galactosyl diacyl glycerol (DGDG) et sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) est observée. Les MGDG et DGDG sont les constituants membranaires majoritaire des thylakoïdes et leur disparition suggère une dégradation des chloroplastes associée à la baisse des capacité photochimiques observée

pendant l'infection virale (Evans et al., 2006; Guschina and Harwood, 2006). Il est également observé une transition dans la nature des chaînes d'acides gras de ces galactolipides avec une baisse des acides gras 18:4 et 18:5 vers des acides gras plus courts et saturés 16:0 et 14:0. Bien que la teneur en SQDGs baisse, cette classe de composés devient proportionnellement majoritaire (Evans et al., 2009). De manière surprenante, les quantités de phospholipides et bétaine lipides ne varient pas dans les cellules infectées, mais plusieurs transitions sont observées. Ainsi dans la classe des phospholipides, les phosphatidyl-*S,S*-diméthylpropanethiols (PDPTs), les phosphatidylcholines (PCs) et les phosphatidylglycérols (PGs) sont massivement remplacés par les phosphatidyléthanolamines (PEs). Il n'existe visiblement pas de voie de conversion entre ces différents phospholipides ce qui indique la synthèse *de novo* du PE et la dégradation des autres phospholipides lors de l'infection. Parmi les bétaine lipides, il est observé une transition de la diacylglycéryl carboxyhydroxyméthylcholine (DGCC) vers la diacylglycéryl triméthylhomosérine (DGTS). Les PEs et les DGTSs ont été identifiés chez de nombreuses algues (hormis la lignée verte en ce qui concerne les DGTSs) et sont des constituants des membranes extraplastidiales. Les auteurs postulent que ces constituants, selon leur abondance et la nature des chaînes d'acide gras, pourraient jouer un rôle dans l'infection virale en modifiant la nature des membranes. Enfin c'est au sein de cette étude que les chercheurs décrivent pour la première fois chez *E. huxleyi* et son virus plusieurs glycosphingolipides avec un acide sialique en tête polaire. Leur rôle supposé dans la reconnaissance hôte-virus a été décrit dans la section 2.2.

En 2014, une première étude intégrative sur l'interaction *E. huxleyi*-EhV est publiée, où les données d'expression de gène (analyse RNAseq) sont comparées aux données d'une analyse métabolomique (Rosenwasser et al., 2014). Les expériences mettent en évidence une augmentation de l'activité glycolytique afin de fournir en énergie et en précurseurs la biosynthèse *de novo* d'acide gras. En effet, une forte augmentation de la concentration en acides gras saturés est observée chez l'hôte pendant l'infection (Evans et al., 2009). Le succès de l'infection est très fortement lié à ce changement métabolique vers une production accrue de lipides. L'inhibition chimique de l'acide gras synthase, une enzyme clé dans la synthèse des acides gras, induit de manière dose dépendante une réduction de la production de particules virales par les cellules infectées sans pour autant affecter la production d'ADN viral. La voie des pentoses phosphates (voie du métabolisme énergétique au même titre que la glycolyse) ainsi que la production d'acides aminés sont fortement stimulées. La stimulation de ces différentes voies métaboliques semble être un phénomène conservé au sein de système hôte-virus

évolutivement très divergents, puisqu'il est observé lors de la phase infectieuse des Cytomégalovirus humain, des Herpès Virus ou encore des virus de l'hépatite C (Blackham et al., 2010; Delgado et al., 2012; Rosenwasser et al., 2014; Zhang et al., 2019). *A contrario*, la synthèse de nombreux stéroïdes est réprimée lors de l'infection. *E. huxleyi* possède deux voies de biosynthèse de précurseurs des stéroïdes : la voie cytosolique du mévalonate (MVA) et la voie chloroplastique du méthyl-érythritol phosphate (MEP) (Lombard and Moreira, 2011). Une inhibition chimique de la voie du MVA conduit à une diminution de la production du nombre de particules virales par l'hôte, suggérant une implication spécifique des produits de la voie du MVA dans la production virale. Les triterpènes issus des voies du MVA et du MEP sont les précurseurs des stérols, des constituants essentiels des membranes eucaryotes mais aussi des virus (Dhar et al., 2013; Wudiri et al., 2014). La modulation de la voie de biosynthèse des stérols peut être vue comme une stratégie de défense pour l'hôte. Pour information la voie du MVA est absente chez les Prasinophytes (Rohmer, 2010) et les travaux menés chez les Prasinovirus n'ont pas permis à ce jour d'identifier des stérols.

Une étude fonctionnelle récente révèle l'expression d'un ensemble d'enzymes virales de la voie de biosynthèse des sphingolipides chez *E. huxleyi* dont les spécificités de substrat sont différentes de celle de leurs homologues hôte (Ziv et al., 2016). L'enzyme virale précurseur de la voie est une sérine-palmitoyle-transférase (SPT) 5'-phosphate (PLP)-dépendante qui a pour substrat l'acide pentadécanoïque-CoA (C15:0) (au lieu de l'acide palmitique-CoA C16:0). Le produit de synthèse est une sphingosine à chaîne plus courte et possédant un nombre impaire d'atomes de carbones qui sert de substrat à la synthèse d'un ensemble de sphingolipides viraux spécifiques (Schleyer et al., 2019). Ces sphingolipides inhabituels qui composent la membrane du virus semblent jouer un rôle essentiel dans l'assemblage, la structure et l'infectivité du virus (Malitsky et al., 2016). Chez *E. huxleyi* comme chez le VIH et le virus de l'hépatite C, les sphingolipides déterminent la localisation subcellulaire du virus dans la cellule hôte et notamment son bourgeonnement (sortie) au niveau des radeaux lipidiques de la membrane de la cellule hôte (Brugger et al., 2006; Mackinder et al., 2009; Sakamoto et al., 2005). L'étude de ces radeaux lipidiques enrichis en sphingolipides chez *E. huxleyi* a révélé la présence de plusieurs complexes protéiques impliqués dans la défense, l'immunité acquise et la mort cellulaire programmée (Rose et al., 2014). Parmi ces protéines une calmoduline (*calcium-modulated protein*) avec un domaine MAP-kinase (*mitogen activated protein*) a été identifiée. Elle est associée à l'induction de la mort cellulaire programmée mais aussi au contrôle des échanges cellulaires au travers de la régulation des protéines G impliquées dans la formation et

le transfert des vésicules (Marat et al., 2011). Une extensine riche en proline (*Prolin-Rich Extensin*) a été identifiée, son activation signale une déformation de la membrane cellulaire lors de l'entrée d'un pathogène dans la cellule hôte (Sanabria et al., 2010). Enfin, les motifs protéiques *Toll Interleukin 1 Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat* (TIR-NB-LRR) ont pu être identifiés. Ce complexe est spécialement impliqué dans la reconnaissance des membranes virales et l'induction de la réponse hypersensible caractérisée par l'induction de la mort cellulaire programmée chez les plantes (Heath, 2000). La mort cellulaire programmée est définie par une diminution de la taille de la cellule, une déstructuration de leur membrane, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN sous l'action de différentes enzymes. Ce mécanisme de défense est présent chez les cyanobactéries et semble hérité de l'ancêtre commun du phytoplancton (Ameisen, 2002). Chez le phytoplancton, il semble nécessaire de souligner le rôle essentiel des capsases et métacapsases dans la mort cellulaire programmée (Bidle, 2016). Ces enzymes sont des protéases à cystéines qui reconnaissent une séquence peptidique spécifique qu'elles hydrolysent. Elles peuvent dégrader ainsi une grande diversité de protéines jusqu'à induire la mort de la cellule. Les mécanismes par lesquels la synthèse de ces protéases est induite chez le phytoplancton ne sont pas encore connus. Toutefois, il a été observé chez *E. huxleyi* que la présence de vGSL induisait de manière dose dépendante la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme H_2O_2 et O_2^- qui pourraient être des médiateurs de la synthèse des protéases (Bidle et al., 2007; Evans et al., 2006; Sheyn et al., 2016). En effet, au début de l'infection le virus EhV induit le clivage de diméthylsulfoniopropionate (DMSP) en diméthylesulfure (DMS) et acide acrylique (AA) qui sont de puissants antioxydants capables d'éliminer les espèces radicalaires (O_2^-) et H_2O_2 (Sunda et al., 2002), aucun signe de sénescence de l'algue n'est observé mais en fin de cycle lytique la production de DMS et AA est réprimée et l'activité des protéases est fortement stimulée induisant la mort des cellules. La production de ROS et l'induction de l'activité caspase semblent jouer un rôle important dans la stratégie d'infection chez plusieurs virus de la famille des *Phycodnaviridae* puisque des mécanismes similaires et des séquences ADN de capsases ont été identifiés au sein des systèmes hôte-virus *Haptolina ericina*-CeV01B et *Phaeocystis pouchetii*-PpV01B et des virus *Paramecium bursaria Chlorella Virus 1* (PBCV-1) et *Ectocarpus siliculosus Virus 1* (EsV-1) (Bidle et al., 2007; Ray et al., 2014; Van Etten et al., 2019). Les mécanismes régulant la mort cellulaire programmée illustrent parfaitement la coévolution entre un hôte et son virus, chacun l'exploitant et contournant les défenses mises en place par l'autre pour survivre ou se répliquer : l'hôte utilise cette stratégie afin d'empêcher la réplication virale et le virus au contraire la favorise afin d'amplifier sa réplication. A l'échelle

d'une population phytoplanctonique la stratégie de la mort cellulaire est cohérente car elle permet une élimination des cellules sensibles au virus et endommagées et réduit la compétition pour les ressources. Ainsi, la manière dont une cellule phytoplanctonique va induire la mort cellulaire programmée sera fortement liée à son degré de parenté avec les cellules voisines, impactant ainsi directement leur *fitness* (Durand et al., 2011). En effet, l'analyse des différents allèles associés aux gènes de la mort cellulaires programmée (PCD) au sein de différentes communautés phytoplanctoniques montre une augmentation de la fréquence de ces allèles lorsque la stratégie de la PCD est associée à une augmentation de la valeur sélective de la population (Rynearson and Armbrust, 2005) comme dans le modèle de sélection de parentèle (*Kin selection*) (Hamilton, 1964).

Les systèmes hôte-virus sont souvent étudiés lorsque les particules virales et leur hôte sont en contact mais de récentes études suggèrent l'implication de mécanismes de communication à distance entre cellules hôtes pouvant limiter ou amplifier le pouvoir infectieux du virus. Ces communications intercellulaires sont nombreuses entre les différents microorganismes de l'environnement marin et déterminent de nombreuses interactions comme la croissance d'une population, la prédation ou encore la pathogénicité d'un virus. Elles ont un effet profond sur la structuration des communautés (Pohnert et al., 2007). Ces communications s'opèrent au travers de messagers chimiques, protéines ou séquences nucléotidiques qui diffusent directement dans le milieu marin ou à l'intérieur de structures protectrices appelées vésicules extracellulaires (VE) (Biller et al., 2014; Gill et al., 2019). Les VE semblent produites au sein de très nombreux systèmes hôtes-virus lors de la phase infectieuse, elles transportent aussi bien des messagers chimiques hôte que viraux, voire parfois des virus, qui peuvent induire ou réprimer la réponse immunitaire de l'hôte (Urbanelli et al., 2019). Le système *E. huxleyi*-EhV demeure le seul étudié chez le phytoplancton eucaryote pour comprendre le rôle des VE. Ainsi, l'infection virale induit une forte production de VE, composées essentiellement de triacylglycérol (TAG) saturé ce qui les rapproche structurellement des gouttelettes lipidiques (Schatz et al., 2017). Leur membrane est ainsi très différente de celles de l'algue ou du virus. La mise en contact de microalgues saines avec des VE induit chez le phytoplancton une production rapide de TAG, une modification du métabolisme des sphingolipides et le relargage dans le milieu de nouvelles VE. Le même phénomène est observé lorsque du lysat filtré à 100 kDa (*Virus Free Lysat* : VFL) ne possédant plus ni virus, ni vésicules est ajouté à une culture saine. L'analyse du contenu des vésicules révèle la présence de petits ARN liés au métabolisme des sphingolipides et glycolipides, suggérant une régulation possible de ces deux

voies à la suite de l'incorporation des VE. La deuxième expérience met évidence la production de messagers chimiques (*infochemicals*) lors de l'infection capables d'induire la production de VE chez des cellules saines. Lors d'une troisième expérience des VE sont ajoutés à une culture saine d'*E. huxleyi* qui est infectée 24h plus tard par EhV, les observations montrent une incorporation massive des VE par la microalgue et une lyse plus rapide des cellules sensible et un nombre plus élevé de particules virales produites (*burst size*). De nombreuses études montrent des résultats similaires (Urbanelli et al., 2019) pour lesquelles quelques hypothèses ont été proposées ; Chez *Bacillus subtilis* les VE transfèrent des récepteurs membranaires de cellules sensibles vers des cellules résistantes permettant au phage SPP1 d'infecter de nouvelles cellules (Tzipilevich et al., 2017). Cet échange de récepteurs intervient même au travers d'espèces non-hôtes, permettant l'adsorption du phage sur de nouvelles espèces. Les VE ont également été présentée comme le cheval de Troie des virus dans la mesure où elles peuvent transporter des particules virales et être facilement adsorbées par l'hôte, le virus peut ainsi facilement infecter son hôte sans avoir à passer par un système de reconnaissance (Altan-Bonnet, 2016). Ce mécanisme a été observé chez de nombreux systèmes hôte-virus (Gill et al., 2019) et récemment chez les Marseillevirus de la famille de *Phycodnaviridae* (Arantes et al., 2016), la stratégie de propagation des virus au travers des vésicules semble être répandue chez les virus eucaryotes. L'infection virale induit chez *Ostreococcus* la production de vésicules avec et sans virus. La production de VE avec virus intervient chez les cultures résistantes productrices de virus où les particules virales quittent la cellule par bourgeonnement au sein d'une vésicule (Thomas et al., 2011). Toutefois, le contenu de ces vésicules n'a jamais été étudié, ni d'un point de vue moléculaire (ADN) ni chimique, leur rôle demeure totalement inconnu dans le cadre de l'infection virale.

4. OBJECTIFS DE LA THESE

Les microalgues eucaryotes du genre *Ostreococcus* se sont imposées comme l'un des modèles d'étude des mécanismes de résistance virale chez le phytoplancton aux côtés d'*E. huxleyi*. L'identification de marqueurs génétiques caractéristiques associés à l'immunité antivirale a motivé la création de ce projet de recherche qui s'intéresse à l'exploration de nouveaux marqueurs à l'échelle de l'expression des gènes et du métabolisme de la microalgue.

Les objectifs de ma thèse ont été (i) de **sélectionner un modèle hôte-virus** et de **définir un protocole d'analyse** optimal pour l'analyse **métabolomique** du système hôte-pathogène,

(ii) identifier les **marqueurs métaboliques** et **transcriptomiques** de l'immunité antivirale chez la microalgue eucaryote *Ostreococcus mediterraneus* et **corrélér ces deux niveaux d'expression** et enfin (iii) réaliser l'**analyse métabolomique du virus OmV2** infectant la souche sensible d'*O. mediterraneus* précédemment étudiée.

CHAPITRE II – DIVERSITE METABOLOMIQUE DES PRASINOPHYTES. LA METABOLOMIQUE COMME OUTIL DE COMPREHENSION DE L’HISTOIRE EVOLUTIVE DU PHYTOPLANCTON EUCARYOTE ?

Le premier objectif de cette thèse a été motivé par la nécessité de définir un protocole d’analyse métabolomique qui permette l’étude d’une large gamme de métabolites chez les microalgues. Ce premier article présente l’analyse métabolomique d’une douzaine d’algues eucaryotes unicellulaires dont six *Mamiellophyceae*. Ce travail a permis de définir un protocole analytique adapté à une analyse holistique du métabolome. Il a également permis de rendre compte fidèlement de la diversité spécifique du phytoplancton à l’échelle du métabolome et confirme le potentiel de la chimiotaxonomie comme outil de caractérisation et de discrimination des microalgues au même titre que peuvent le faire les gènes.

Article

Metabolomic Insights into Marine Phytoplankton Diversity

Rémy Marcellin-Gros ^{1,2}, Gwenaël Piganeau ^{2,*} and Didier Stien ^{1,*}

¹ Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologie Microbiennes, LBBM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France; marcellin-gros@obs-banyuls.fr

² Sorbonne Université, CNRS, Biologie Intégrative des Organismes Marins, BIOM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

* Correspondence: gwenael.piganeau@obs-banyuls.fr (G.P.); didier.stien@cnrs.fr (D.S.); Tel.: +33-468887343 (G.P.); +33-430192476 (D.S.)

Received: 30 November 2019; Accepted: 22 January 2020; Published: 25 January 2020

Abstract: The democratization of sequencing technologies fostered a leap in our knowledge of the diversity of marine phytoplanktonic microalgae, revealing many previously unknown species and lineages. The evolutionary history of the diversification of microalgae can be inferred from the analysis of their genome sequences. However, the link between the DNA sequence and the associated phenotype is notoriously difficult to assess, all the more so for marine phytoplanktonic microalgae for which the lab culture and, thus, biological experimentation is very tedious. Here, we explore the potential of a high-throughput untargeted metabolomic approach to explore the phenotypic–genotypic gap in 12 marine microalgae encompassing 1.2 billion years of evolution. We identified species- and lineage-specific metabolites. We also provide evidence of a very good correlation between the molecular divergence, inferred from the DNA sequences, and the metabolomic divergence, inferred from the complete metabolomic profiles. These results provide novel insights into the potential of chemotaxonomy in marine phytoplankton and support the hypothesis of a metabolomic clock, suggesting that DNA and metabolomic profiles co-evolve.

Keywords: chemotaxonomy; phylogeny; mamiellales; galactolipids; betaine lipids; xanthophylls

1. INTRODUCTION

Phytoplanktonic eukaryotes are phylogenetically highly diverse, as they have many representatives in most super-groups of the eukaryotic tree of life [1,2]. The Archaeplastida super-group, or green lineage [3], includes all of the species that have descended from a primary endosymbiosis event, when an ancestral eukaryotic cell engulfed a photosynthetic prokaryote, that eventually evolved into an organelle, the chloroplast [4]. Our knowledge on the diversity of phytoplanktonic green microalgae has greatly increased with the democratization of DNA sequencing and genomics, but it is likely to stay behind that of their terrestrial relatives, including land plants, whose estimated species number exceeds 400,000 [5]. This is not surprising since unicellular organisms are generally less studied than multicellular organisms, and because bona fide species identification relies on tedious sampling and isolation steps which have yet to be performed for many marine microalgae. Recently, DNA sequencing of

numerous environmental marine water sample extracts collected worldwide during the Ocean Sampling Day initiative provided evidence that many of the sequences detected belong to species from the green lineage that have no representative strains in culture [6]. This study also demonstrated the very broad geographic distribution of species from the class Mamiellophyceae, that dominates the picoeukaryotic fraction (cell diameter <3 μm) [7] in many coastal areas and thus plays a key ecological role in marine food webs. These picoalgae exemplify the ecological success of miniaturized eukaryotic cells [8] displaying a simple cellular organization (one mitochondrion and one chloroplast) and high surface–volume ratio, which is likely to confer advantages in nutrient-poor environments [9]. The Mamiellophyceae lineage is ancient, probably over 350 million years old [10], and currently comprises 22 described species [11]. Species from the three genera *Bathycoccus*, *Micromonas*, and *Ostreococcus* are particularly prevalent in the marine environment [6].

Historically, analysis of pigment composition has been used to assist the classification of microalgae. Indeed, *Bathycoccus*, *Micromonas*, and *Ostreococcus* species were found to contain characteristic pigments of many marine green microalgae, prasinoloxanthin [12], but also specific pigments such as uriolide, micromonal, and dihydrolutein [13], which were not detected in other species outside the Mamiellales.

The advent of metabolomics now enables the metabolic signatures of microalgae to be explored at an unprecedented level of resolution [14]. These novel approaches have led to the discovery of new metabolites, fostered by the search for natural bioactive compounds with applications in agronomic, medical, or biofuel research. Indeed, polyunsaturated fatty acids (PUFA) are lipids with high nutritional value [15] and may have applications in the prevention of several pathologies, such as cancers or cardiovascular diseases [16,17]. Furthermore, the anti-inflammatory and antiviral properties of polar lipids have also been highlighted recently [18,19].

Here, we explored the potential of an untargeted metabolomic approach including pigments, lipids, and other uncharacterized metabolites to investigate chemotaxonomic markers in 12 marine microalgal strains from 11 species, including 9 microalgae from the green lineage; the Mamiellales *Ostreococcus tauri* [20], *O. mediterraneus* [21], *Bathycoccus prasinos* [22], *Micromonas commoda* [23], and *Mantoniella* sp., the Chlorellales *Picochlorum costavermella* [24], and strains from basal groups *Nephroselmis* sp. and *Pyramimonas* sp. To broaden the phylogenetic diversity of the dataset, two additional marine microalgae outside the green lineage were included: *Phaeodactylum tricornerutum* (Stramenopile lineage) and *Pavlova lutheri* (Haptophyta lineage). We assess whether total metabolomic profiling enables us to delineate well-defined species, and we characterize the 10 major compounds of each species. Last but not least, we assess whether distances between metabolomic profiles, integrating both the composition and the frequency of each compound, reflect phylogenetic distances between species. This leads us to discuss the hypothesis of a metabolomic corollary of the molecular clock, a central tenet of molecular evolution.

2. RESULTS

2.1. AN UNTARGETED HOLISTIC ANALYSIS OF METABOLOMIC PROFILES

To investigate metabolome diversity in 12 divergent algae, an untargeted holistic approach was chosen to cover a broad range of metabolites, such as lipids or pigments known as algal biomarkers. Algal ethyl acetate extracts were analyzed by UHPLC-ESI⁺-HRMS², and acquired ion chromatograms were processed through an untargeted metabolomic workflow in Compound Discoverer 2.1 software (Thermo Scientific) to generate extracted ion chromatograms across samples, detect and quantify corresponding metabolites, and generate the observations/variables matrix used for further statistical analyses. As a first observation, 2565 ions were detected across all samples, and 1143 ions were unique features detected in only one species. Moreover, detected features ranged from 867 ions in *O. tauri* sp. 1 to 241 ions in *Pyramimonas* sp. 1422 ions are shared between at least two species (Figure S1). These observations suggest high variation in the diversity of produced metabolites. To display this variation,

an initial principal component analysis (PCA) was conducted on the observations/variables matrix to compare metabolomic profiles between strains at the global metabolome scale (Figure 1). Principal Components (PCs) 1 and 2 describe 34.8% of the variation, and the first PC separates Mamiellales from the two microalgae *P. lutheri* (Haptophyta lineage) and *P. tricorutum* (Stramenopile lineage), hereafter considered outlier microalgae as they are not part of the green lineage. The second PC separates *Ostreococcus* species from other Chlorophytes (*Nephroselmis*, *Pyramimonas*). Interestingly, intraspecific metabolome diversity seems minimal as compared to within-replicate variation, as the two *O. tauri* strains' PCA confidence ellipses overlap.

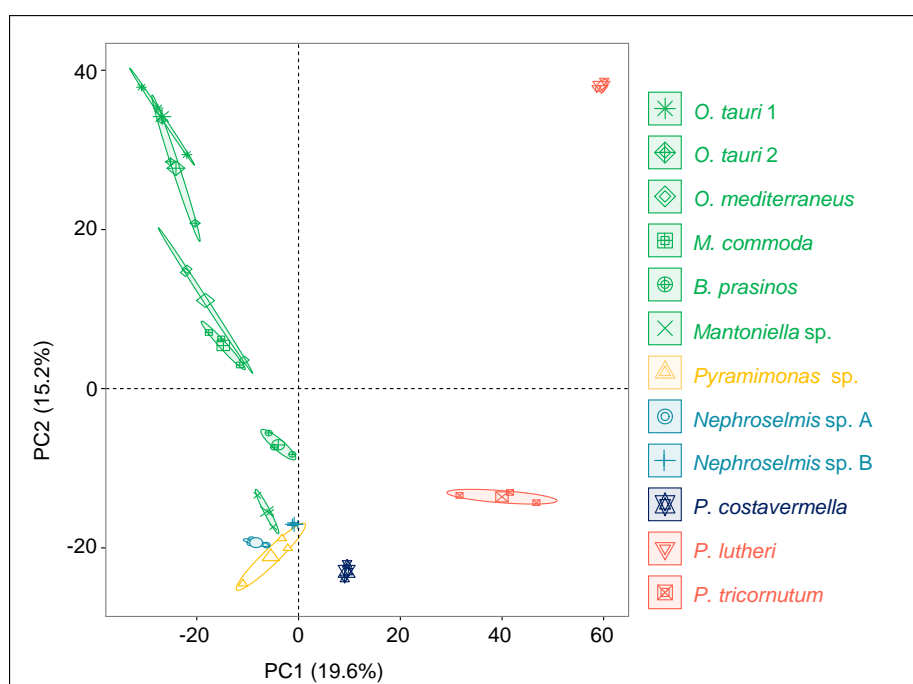


Figure 1. Principal Component Analysis of the whole metabolome of 12 marine microalgae. For each species and strain, confidence ellipses cover 95% of group position estimation.

2.2. IDENTIFICATION OF THE MAJOR METABOLITES AND DETECTION OF CHEMOTAXONOMIC MARKERS

In order to go further into the comparative metabolic profiling of the 12 strains, the 10 major metabolites of each strain, defined as the 10 highest peak areas of the extracted ion chromatograms (XIC), were identified (Figure 2). Identification was carried out by comparing compound raw formulas (calculated on the basis of high-resolution mass spectrometry) to databases (Dictionary of Marine Natural Products and SciFinder) to retrieve candidate compounds, then MS² spectra were submitted to databases for comparison (Global Natural Products Social Molecular Networking—GNPS [25]) or elucidated to infer putative structures. Compounds were classified into 10 different groups of polar lipids and pigments. Among the polar galactolipids, eight were monogalactosyl diacylglycerols (MGDGs) (Figure S2), two were monogalactosyl monoacylglycerols (MGMGs or Lyso-MGDGs), and one was a sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) (Figures S4 and S5).

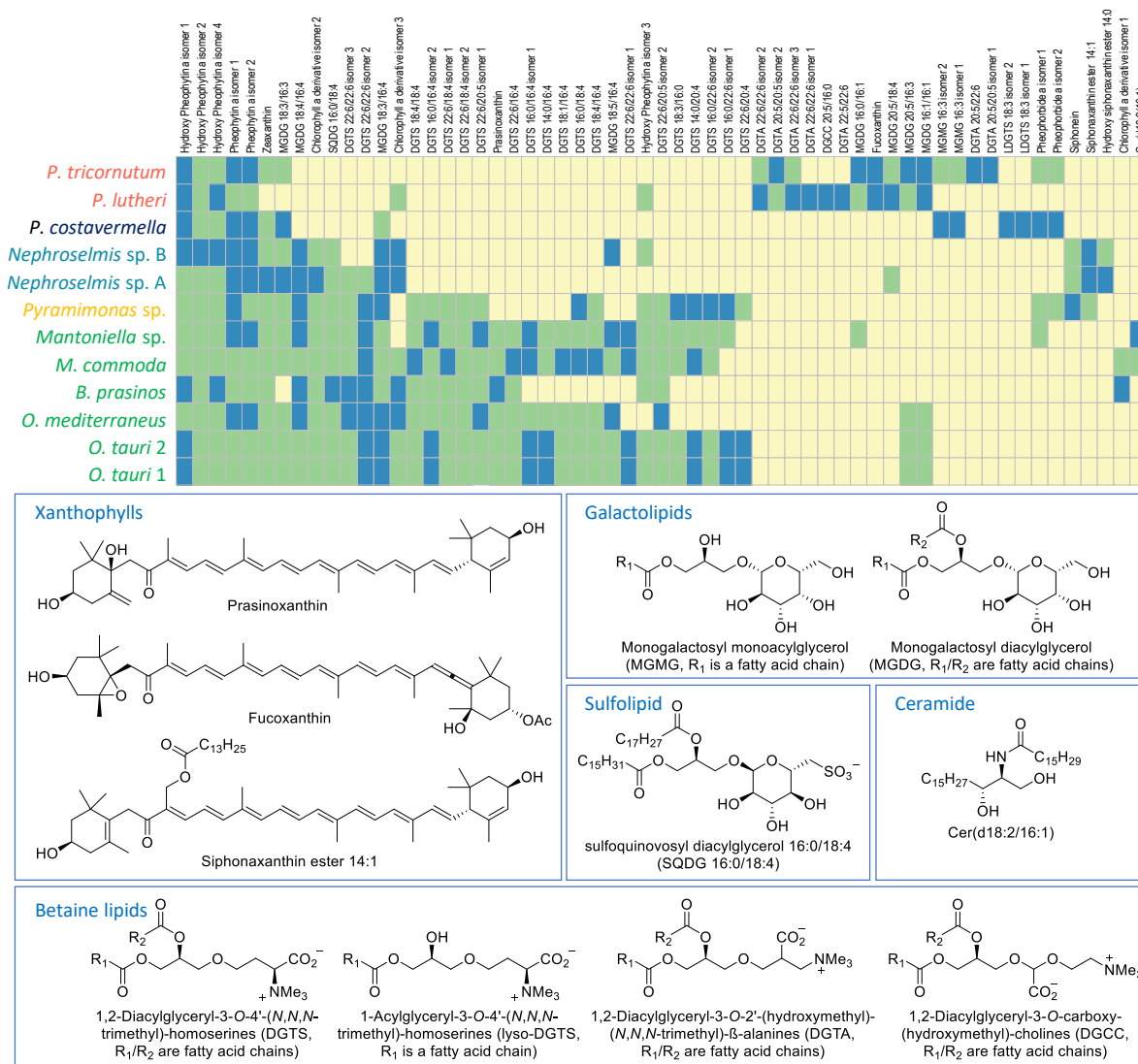


Figure 2. Matrix of the top 10 (blue), detected (green), and not detected (yellow) metabolites, and structure examples of the 59 most abundant compounds over the 12 microalgal strains. For all compounds, identifications are based on (1) molecular formulas, (2) automatic assignment via Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), (3) interpretation of MS² spectra and comparison with published data, and (4) phylogeny.

For MGDGs and SQDGs, the regiochemical assignment (*sn*-1 and *sn*-2 positions) of both fatty acid (FA) chains was done by comparing the MS² fragmentation patterns. The fragment resulting from *sn*-1 FA loss ([M+X-R₁CO₂H]⁺) exhibits a higher peak intensity than the one resulting from *sn*-2 FA loss ([M+X-R₂CO₂H]⁺) for the protonated adduct (X = H) of SQDGs [26] and sodiated adduct (X = Na) of MGDGs [27]. Besides this, it has been established in the literature that the sugar moiety is a galactose for glycolipids and a sulfoquinovose for SQDG [28]. The betaine lipids are the most represented and diversified group with twenty 1,2-diacylglyceryl-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserines (DGTSS) (Figures S6 and S7), seven 1,2-diacylglyceryl-3-O-2'-(hydroxymethyl)-(N,N,N-trimethyl)-β-alanines (DGTAs), two 1-acylglyceryl-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserines (lyso-DGTSs), and one 1,2-diacylglyceryl-3-O-carboxy-(hydroxymethyl)-choline (DGCC) (Figure S8). Regiochemical assignment of FAs was done as for galactolipids on the basis of MS² spectra. Here, the collision-induced [M + Na-R₂CO₂H]⁺ fragment of sodiated adducts produced a higher peak than the [M+Na-R₁CO₂H]⁺ fragment [29]. Distinction of the isomeric DGTAs and DGTS betaine lipids was performed on the basis of strain phylogeny in case of

coelution. The fragmentation pattern commonly described for these lipids includes the characteristic 59 Da neutral loss corresponding to the loss of trimethyl amine (NMe₃) and the 87 Da neutral loss (CH₃-CH⁺-N⁺Me₃) for DGTs as a consequence of fragmentation after transposition of the carboxyl group [30]. Unfortunately, this fragmentation reaction was not observed in our analyses. According to the literature, DGTAs are specific to brown algae (*P. lutheri* and *P. tricor nutum*) while DGTs are produced by microalgae from the green lineage [28]. On the pigment side, 11 chlorophylls (Figures S9–S23) and 6 xanthophylls (Figures S24–S30) appeared to be largely shared among strains. In the xanthophyll series, one compound was identified as either prasinoxanthin or its isomer violaxanthin. The uncertainty was eventually disentangled thanks to the typical dehydration fragmentation pattern of prasinoxanthin (Figure S28), while an 80 Da neutral loss was observed for the epoxy carotenoid violaxanthin (Figure S29) [31]. Fucoxanthin (Figure S30) was unambiguously identified from specific fragments at *m/z* 109.1014, 581.3975, and 641.4207 in MS² [32]. Apart from the polar lipids and pigments, a ceramide non-hydroxy fatty acid sphingosine (Cer) (Figure S31) was also identified.

The most abundant and diversified metabolites identified over the 12 strains were polar lipids and pigments. These observations are consistent with an increasing number of studies concerning the analysis of algal lipidomes [28,33] and provide new lipidome information for the strains *Mantoniella* sp., *Nephroselmis* sp., and *Pyramimonas* sp. recently isolated from environmental samples. Further phylogenetic signals of metabolites are given and discussed in the following section.

The 10 major metabolites of each microalga shown above were chosen to construct a new matrix of compound abundance to perform a second PCA (Figure 3A). Remarkably, the variability explained by the two PCs remained similar (38.8%), and so did the pattern of clustering of the different strains as compared to the first PCA conducted on the whole metabolome analysis. The first PC again discriminated the outlier microalgae *P. lutheri* and *P. tricor nutum* from the Mamiellales, while PC2 separated *P. costavermella* from the brown algae, and the green microalgae fanned out along this axis. The contribution of each major metabolite to a strain or group of algae can be inferred from the biplot projection of the PCA (Figure 3B–D). The first PC separates the green microalgae from the outlier brown ones, and as expected, this distinction is primarily due to the betaine lipids DGTAs and DGTs. The high chemical diversity of DGTs is due to a greater variability in the acyl chain length and number of unsaturations, while DGTAs hold only long (C20–C22) and highly unsaturated acyl chains (Figure 2). MGDGs are represented in every species. MGDGs 18:3/16:4, 18:4/16:4, and 18:5/16:4 are only found in green microalgae. They predominate in the Mamiellales as previously described by Degraeve-Guilbault et al. [34]. Major galactolipids of the brown algae *P. tricor nutum* contain 16:0, 16:1, 16:3, and 20:5 fatty acid chains, which is also consistent with previous analyses, reinforcing the reproducibility of these observations [29]. Interestingly, MGMGs are only detected in *P. tricor nutum* and *P. costavermella*. Usually, these lipids are not extensively studied in the literature and may be associated with lipid remodeling or environmental plasticity [35]. Some strains can exhibit metabolites exclusive to their group. DGCCs are present in *P. lutheri* but absent in *P. tricor nutum* and may be a biomarker of haptophytes [28,36]. This is largely described in the literature, but we also show here that fucoxanthin occurs in the lineage containing *P. lutheri* and *P. tricor nutum*. On the other hand, C14 esterified siphonaxanthin (Figures S25–S27) and siphonein (Figure S29) are specific to the Chlorophytes *Nephroselmis* and *Pyramimonas*. In fact, these pigments are widely found in green algae, especially in deep-water or shade species, as they improve the efficiency of light-harvesting complexes [37] or protect the cells from high light damage. Moreover, prasinoxanthin (Figure S31) is the major xanthophyll that identifies Mamiellales amongst other green algae [12].

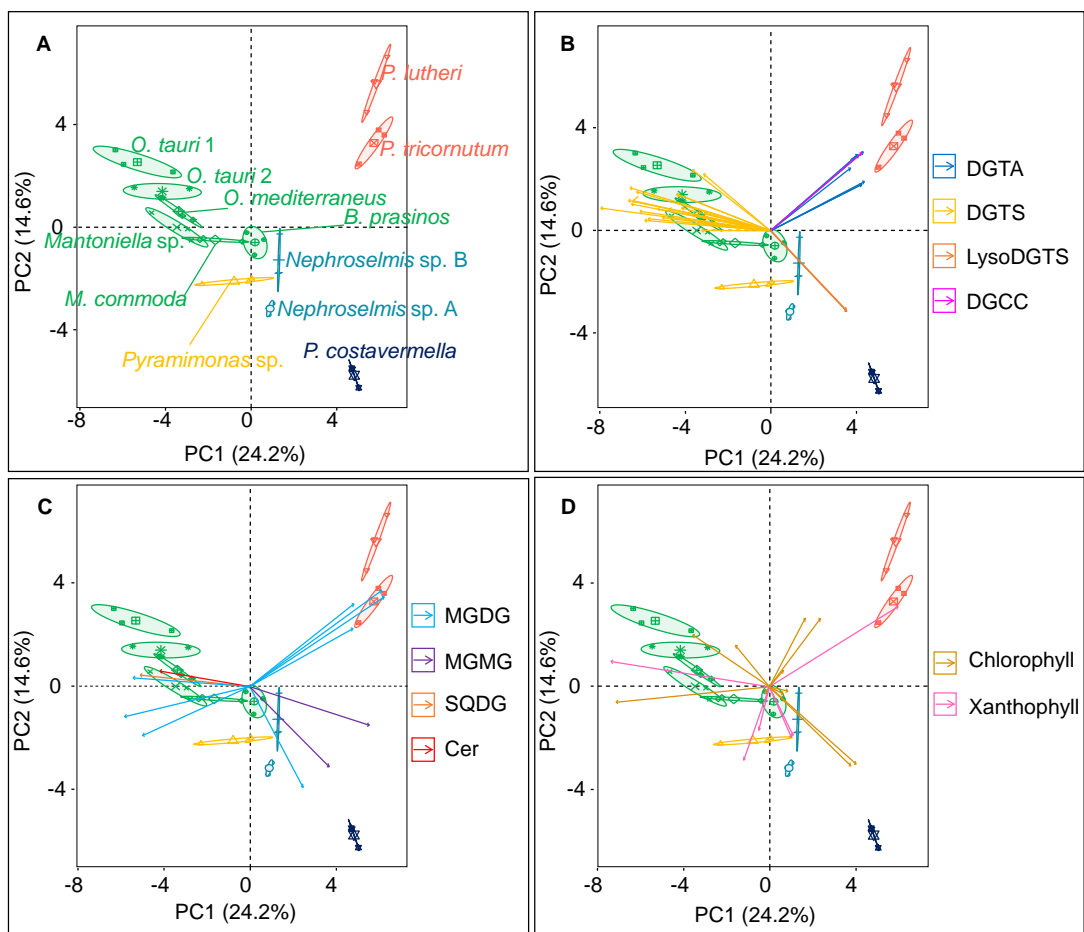


Figure 3. (A) Principal component analysis (PCA) constructed from the 59 most abundant metabolites matrix over the 12 microalgal strains, and the corresponding biplots of the (B) betaine lipids, (C) galactolipids, sulfolipids, and ceramide, and (D) pigments (each arrow corresponds to a metabolite). Confidence ellipses cover 95% of group position estimation. Arrow coordinates correspond to the contributions of metabolites to the PC and color to the metabolite class. Arrows point toward the strains where they are the most represented.

Beyond a simple identification of metabolite classes within microalgal species or lineages, our results demonstrate that some specific metabolites within classes may serve as phylogenetic markers, pending analysis of additional species identified in each group. Our analysis confirms that prasinoxanthin is specific to the Mamiellales, but also that DGTS 22:6/16:4 is specific to microalgae from this group. The number and diversity of DGTS we found between *Pyramimonas* sp. and Mamiellales is an outstanding observation, since these betaine lipids were not detected in *Nephroselmis* sp. or even in *B. prasinos* or *O. mediterraneus*. Within the Mamiellales, the *Ostreococcus* genus differs by the presence of two MGDGs (20:5/16:3 and 16:1/16:1). The species *O. tauri* has six DGTS which are not found in *O. mediterraneus*. Interestingly, the presence/absence matrix does not differentiate both *O. tauri* strains. More data will be necessary to confirm these observations, but the “major metabolites approach” does indeed appear to be interesting for differentiating between these microalgae at the species level.

The choice of taxonomic chemical biomarkers is always challenging as the diversity and abundance of metabolites should reflect species divergence rather than intrinsic variability due to environmental factors. To get around this, chemical classification of plants has been preferentially achieved by comparison of secondary metabolites since these are remarkably diverse [38], include numerous classes of compounds (glycosides, phenolics, or alkaloids) [39], and are relevant for species classification, as they are restricted to taxonomically related groups of species [40,41]. Comparison of algae has so far relied

on pigment analysis using 44 pigment types spanning 27 classes of photosynthetic algae [42], and these pigments are consistent with the endosymbiotic evolutionary history of eukaryotes [43]. More recently, many efforts in algal compound screening have enabled the description of hundreds of new metabolites each year [44], which provide the opportunity to identify species from a broader spectrum of compounds. Algal lipids have been extensively described in model species such as *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp., or *P. tricornutum* [29,45–47], while complete lipidome profiles have yet to be acquired for most algae. Nonetheless, lipids, especially FAs [48–50], sterols [50], alkenones [51], or polar lipids [52,53], are widely used as species tracers. It is important to keep in mind that lipid profiles may be impacted by environmental, biotic, or abiotic factors [54], as demonstrated in many studies on nutrient availability, irradiance, and growth stage [29,34,55,56]. However, even though taxonomic signals may be diminished by external factors, it has been shown that taxonomy accounts for 3 to 4 times more variance in the lipid profiles of phytoplankton than abiotic factors [49]. Besides this, polar lipids, especially betaine lipids (DGTA/S, DGCC), constitute the least impacted metabolite class by growth stage as demonstrated by Cañavate and colleagues, and they are therefore considered reliable lipidic taxonomic markers [57]. The abundancy profiles of “major metabolites” are consistent across experiments from available studies performed at the molecular level [29,34,58], suggesting that they are relevant chemotaxonomic marker candidates.

2.3. PHYLOGENETIC ANALYSIS AND METABOLOME-BASED TAXONOMY

The phylogeny based on the partial analysis of the 18S rDNA subunit was consistent with previous findings based on a larger set of sequence data [1,59] retracing the molecular divergence between species and the different microalgal families (Figure 4A) and was therefore used as a reference for comparison with the information from the metabolome of each microalga.

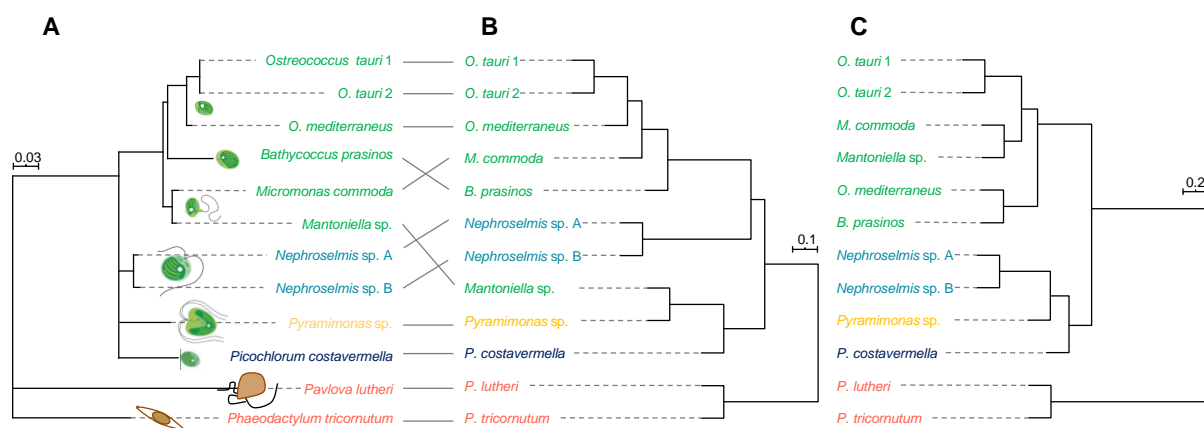


Figure 4. (A) Partial 18S ribosomal gene phylogeny based on 429 base pairs; scale indicates substitution per site. (B) A hierarchical clustering dendrogram based on 3138 metabolites; the scale represents the Spearman correlation coefficient between strains. (C) A hierarchical clustering dendrogram based on the 59 most abundant metabolites; the scale represents the Spearman correlation coefficient between strains.

First, hierarchical clustering analysis (HCA) was performed to determine the metabolomic proximity between strains. The HCA dendrogram (Figure 4B) was generated by calculating the distance matrix between strains based on the Spearman correlation coefficient and aggregated by “complete linkage”. A clear clustering of Mamiellales species emerged from HCA, except for *Mantoniella* sp., which exhibited a metabolomic profile more closely related to *Pyramimonas* sp. This peculiarity disappears when the metabolome is reduced to the 10 major metabolites to build the chemotaxonomy (Figure 4C). This suggests that major compounds tend to be reliable species biomarkers when comparing divergent as

well as closely related organisms. Microalgal cultures are very rarely axenic, since a bacterial community often co-exists with microalgae [60]. Estimation of the proportion of bacteria by cytometry revealed that most cultures contained less than 5% bacteria, while it turned out that both *Mantoniella* sp. and *Pyramimonas* sp. could not be cleansed of bacterial partners (microalgae/bacteria ~1:1). This may be a consequence of their mixotrophic regime [61,62]. The clustering of these strains may thus be due to the metabolomic contribution of bacteria, either because of identical metabolites of bacterial origin or through a similar microalgae–bacteria interaction process that may dramatically influence the metabolome of the microalgal partner. However, we demonstrate here that algal metabolites predominate in the total extract, so bacterial participation disappears when considering the major metabolites only. Besides this, statistical comparison of genetic distances with metabolomic distances based on whole-metabolome analysis amongst algae confirms a strong correlation between both approaches (Mantel test: $r=0.77$, p -value = 0.001). Thus, there is a good overlap of phylogenetic and chemotaxonomic signals, as metabolomic distances reflect genetic distances between species. This correlation is even stronger when estimated from the most abundant metabolites (Mantel test: $r = 0.90$, p -value = 0.001), confirming the robustness and potential of the metabolomic approach to discriminate and retrace the evolutionary history of divergent species.

Establishing the full lipidome profile of algae at the molecular level within and between species is relevant for several reasons. First, it provides a fundamental description of the species at the metabolite level and helps to estimate the chemical divergence between strains or species. Secondly, it can lead to the identification of algal species producing interesting bioactive compounds, such as high-value carotenoids and lipids, with agronomical and pharmaceutical applications. The present study highlights the abundance of long-chain polyunsaturated FA, such as octadecapentaenoic acid (18:5n-3), eicosapentaenoic acid (20:5n-3), or docosahexaenoic acid (22:6n-3), the health benefits of which have been previously recognized [63], for example, in preventing cardiovascular or mental disorders [64–66]. Moreover, particularly abundant in Mamiellophyceae, polar lipids and especially MGDG 18:3/16:4 and MGDG 18:4/16:4 of *Tetraselmis* sp. have effective anti-inflammatory properties [67,68]. *P. lutheri*'s major galactolipid MGDG 20:5/18:4 has also been shown to have anti-inflammatory activity [69], inhibiting both human melanoma cell growth [70] and bacterial development [71]. Last but not least, SQDGs are probably among the most promising compounds in the medical field as lipids from this class are known to act on HIV infection [72], but also exhibit anti-HSV-1 and anti-HSV-2 activities [73] and anti-inflammatory [74] and antitumor properties [75]. The aforementioned bioactive molecules are far from exhaustive but highlight the biotechnological potential of algae as producers of bioactive molecules.

In conclusion, we investigated the metabolomes of 12 microalgal strains from 11 species and characterized the major carotenoids and lipids. The approach of using major metabolites allows microalgal species and lineages to be distinguished. Evolutionary divergence between species can be inferred, in good congruence with the phylogenies obtained from sequence data obtained through a classical molecular approach. Therefore, these results support the hypothesis of a metabolomics equivalent to the “molecular clock” based on the analysis of sequence data. The resulting “metabolomics clock” metaphor is also constrained by the technical challenges raised by the “molecular clock” inferred from DNA sequence analysis: What are the mode and tempo of metabolome evolution? Are some metabolites changing faster than others? What is the distribution of fitness effects of metabolite changes? To answer these questions, statistical developments are needed to develop metabolomic distances and larger datasets including additional species should be obtained to include a broader variation in evolutionary distances.

3. MATERIALS AND METHODS

Culture Conditions and Growth Measurement

Cultures were grown in modified Keller Artificial Seawater medium [76] (K-ASWO) containing 420 mM NaCl, 10 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 25 mM MgSO₄, 2.5 mM NaHCO₃, 0.88 mM NaNO₃, 5.0×10^{-5} M NH₄Cl, 1.0×10^{-5} M β -glycerophosphate, 1.0×10^{-8} M H₂SeO₃, 1 mL of 1 M Tris-HCl (pH 7.2) per liter of medium, 3.7×10^{-10} M cyanocobalamin, 2.0×10^{-9} M biotin, and 3.0×10^{-7} thiamine in addition to Keller trace metal solution [77]. Algal strains were cultured in T75 cell culture flasks with ventilated caps (Sarstedt, Germany) containing 100 mL of K-ASWO medium. Each flask was inoculated to a cell density of 1×10^6 cells.mL⁻¹ for *O. tauri* 1 (RCC 6850) and 2 (RCC 4221), *O. mediterraneus* (RCC 2590), *B. prasinus* (RCC 4222), *M. commoda* (RCC 827), *Mantoniella* (RCC 6849), *P. costavermella* (RCC 4223), *P. tricornutum* (RCC 6851), and *P. lutheri* (RCC 6852); 2.4×10^5 cells.mL⁻¹ for *Nephroselmis* sp. A (RCC 6846); 3.3×10^5 cells.mL⁻¹ for *Nephroselmis* sp. B (RCC 6847); and 7.8×10^4 cells.mL⁻¹ for *Pyramimonas* sp. (RCC 6848). Cultures were maintained at a temperature of 20 °C under continuous light of 100 μ E.m⁻².s⁻¹ and were agitated manually once a day; cell density was measured every day by flow cytometry.

Microalgal Culture Axenization

All cultures were treated with antibiotics to lower the bacterial concentration. Quantities of 50 μ g.mL⁻¹ ampicillin (A9518, Sigma-Aldrich), 50 μ g.mL⁻¹ gentamycin (G1914, Sigma-Aldrich), 20 μ g.mL⁻¹ kanamycin (60615, Sigma-Aldrich), and 100 μ g.mL⁻¹ neomycin (N6386, Sigma-Aldrich) were added to K-ASWO, and after two subculturing stages, the bacterial content was low enough to perform metabolomic analysis in most strains. A single antibiotic treatment reduced the bacterial contamination in *Ostreococcus* and *P. lutheri* cultures but was unable to remove bacteria completely in others.

Flow Cytometry

Cells were fixed using glutaraldehyde (0.25% final concentration, G6257, Sigma-Aldrich) with the addition of Pluronic F-68 (0.1% final concentration, P-7061, Sigma-Aldrich) for 15 min in the dark and stained with SYBR Green I (LON50512, Ozyme) for another 15 min in the dark. Cell counting was performed using a Beckman Coulter Cytotflex flow cytometer (laser excitation wavelength 488 nm) by chlorophyll autofluorescence for microalgae (detection filter >620 nm) and by SYBR Green I fluorescence for bacteria (detection bandwidth 525–540 nm, corresponding to the FITC (fluorescein isothiocyanate) channel). Data were analyzed with CytExpert 2.2 software (Beckman Coulter).

Metabolite Extraction

Microalgal cells were collected three to four days post inoculation (Supplemental Figure S1) by filtration of 100 mL of culture through a Whatman GF/F filter (Z242519, Sigma-Aldrich) under reduced pressure (600 mbar). Then, filters were placed in disposable glass culture tubes with 7 mL of ethyl acetate (16371, Sigma-Aldrich) to solubilize algae cells overnight in a C25 incubator shaker (New Brunswick Scientific, 100 rpm, 19 °C).

UHPLC-HRMS Analyses

Microalgal extracts were analyzed on an Ultimate 3000 UHPLC Dionex system coupled to an Orbitrap MS/MS FT Q-Exactive Focus Thermo Scientific mass spectrometer. Samples were solubilized in MeOH (1 mg.mL⁻¹) and 1 μ L was injected onto the column. The column was a Phenomenex Luna Omega Polar C18 (150 \times 2.1 mm, 1.6 μ m, 100 Å) conditioned at 42 °C. The mobile phase was a mixture of water (solvent A) with increasing proportion of acetonitrile (solvent B, 012041, Biosolve), both solvents modified with 0.1% of formic acid. The gradient was as follows: 50% B from 3 min before injection to 1 min after; between 1 and 3 min, a linear increase of B up to 85%, followed by 85% B for 2 min; 89% B

from 5.1 to 7 min; 93% B from 7.1 to 10 min; 97% B from 10.1 to 13 min; and finally, 100% B from 13.1 to 18 min. The flow was set to 0.5 mL.min⁻¹ and injected into the mass spectrometer 1 min after injection (diverted before). Mass spectrometry analyses were performed in the positive electrospray ionization mode in the 133.4–2000 Da range, and mass spectra were recorded in the centroid mode. The mass spectrometer method was set to FullMS data-dependent MS². In fullMS, the resolution was set to 70,000 and the AGC target to 3 × 10⁶ for a chromatogram peak width (FWHM) of 6 s. In MS², the resolution was 17,500, the AGC target 1 × 10⁵, the isolation window 0.4 Da, and the stepped normalized collision energy 15/30/45 with 10 s of dynamic exclusion. The lock mass was calibrated on the Cu(CH₃CN)²⁺ ion at *m/z* 144.9821 Da.

LC-MS Data Preprocessing

Total ion chromatograms were processed through the untargeted metabolomic workflow of Compound Discoverer (CD) 2.1 (Thermo Scientific). A Quality Control mix (QC) composed of the 12 algal extracts was analyzed together with algal extracts and K-ASWO medium used as a blank to remove nonalgal compounds. The CD workflow performs retention time correction, detection of unknown compounds, and grouping across samples; fills gaps when features are absent; hides chemical background (using blank samples); and finally predicts compound elemental composition. The retention time window was set to 2–18 min. The maximum time shift for compound alignment was 0.1 min, the maximum mass tolerance for compound grouping and elemental composition calculation was 3 ppm, and the minimum peak intensity was 2 × 10⁶. This workflow provided an observation/variable matrix used for further statistical analysis.

Confirmation of Algae Identities and Reconstruction of Phylogenies

Algae identification was performed on the basis of partial 18S rDNA sequence analysis. Total DNA was extracted with hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) as described by Winnepenninckx et al. [78]. The 18S rDNA gene region was amplified by PCR using the unique nondegenerate universal eukaryotic forward primer F-566 (5' CAG CAG CCG CGG TAA TTC C 3') and the reverse primer R-1200 (3' CCC GTG TTG AGT CAA ATT AAG C 5') [79] before sequencing by the GATC company.

Then, partial 18S rDNA sequences were aligned using MUSCLE 3.8 [80], and gaps were manually removed to get 429 base pairs sequences. Best substitution model selection and phylogenetic tree reconstruction was performed using IQ-TREE 1.6.12. The best selected model was TIM2e+G4 with the Bayesian Inference Criterion, and 1000 bootstraps were used to construct the consensus phylogenetic tree.

Figure Plotting and Statistical Analysis

All figures were plotted using R 3.6.1. Principal Component Analysis and corresponding biplots were calculated and constructed using the FactoMineR v1.42 package and PCA function with the scaled data option and 95% confidence ellipse lines. The phylogenetic tree was plotted using the phytool v0.6-99 package, and the patristic matrix was calculated using the ape v5.3 package, while the metabolite distance correlation matrix was calculated using the R base stats functions. The Mantel test was performed using the ade4 v1.7-4 package.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1660-3397/18/2/78/s1>, Figure S1: Histogram of detected compounds (A) and occurrence in algal strains (B), Figure S2: Microalgal concentration growth curves over time, Table S1: Algal and bacterial concentration (cells.mL⁻¹) at sampling day for the 12 algae species, Figures S3–S31: Analytical data on microalgal metabolites.

Author Contributions: Conceptualization, G.P. and D.S.; methodology, R.M.-G., G.P., D.S.; data curation, R.M.-G.; writing—original draft preparation, R.M.-G., G.P., D.S.; writing—review and editing, R.M.-G., G.P., D.S.;

supervision, G.P., D.S.; project administration, G.P., D.S.; funding acquisition, G.P., D.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project obtained funding from the Interaction in Marine Organisms initiative of the FR3724 (Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer).

Acknowledgments: We would like to thank Manon Norest and Adrien Cadoudal for their help with strain isolation and molecular sequencing, the BIO2MAR platform for help with metabolomic analyses, the BIOPIC platform for help with cytometry, and the Genophy team members for support and stimulating discussions on this project. Special thanks to Valérie Domien for help with production of the microalgal graphics and Nigel Grimsley for English language corrections.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

4. REFERENCES

1. Not, F.; Siano, R.; Kooistra, W.H.C.F.; Simon, N.; Vaultot, D.; Probert, I. Diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton. In *Advances in Botanical Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; Volume 64, pp. 1–53. ISBN978-0-12-391499-6.
2. Burki, F.; Roger, A.J.; Brown, M.W.; Simpson, A.G.B. The new tree of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* **2020**, *35*, 43–55. [[CrossRef](#)]
3. Leliaert, F.; Verbruggen, H.; Zechman, F.W. Into the deep: New discoveries at the base of the green plant phylogeny. *BioEssays* **2011**, *33*, 683–692. [[CrossRef](#)]
4. Gould, S.B.; Waller, R.F.; McFadden, G.I. Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 491–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lughadha, E.N.; Govaerts, R.; Belyaeva, I.; Black, N.; Lindon, H.; Allkin, R.; Magill, R.E.; Nicolson, N. Counting counts: Revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a review of other recent estimates. *Phytotaxa* **2016**, *272*, 82. [[CrossRef](#)]
6. Tragin, M.; Vaultot, D. Novel diversity within marine *Mamiellophyceae* (Chlorophyta) unveiled by metabarcoding. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Massana, R. Eukaryotic picoplankton in surface oceans. *Annu. Rev. Microbiol.* **2011**, *65*, 91–110. [[CrossRef](#)]
8. Courties, C.; Vaquer, A.; Troussellier, M.; Lautier, J.; Chrétiennot-Dinet, M.J.; Neveux, J.; Machado, C.; Claustre, H. Smallest eukaryotic organism. *Nature* **1994**, *370*, 255. [[CrossRef](#)]
9. Schaum, E.; Rost, B.; Millar, A.J.; Collins, S. Variation in plastic responses of a globally distributed picoplankton species to ocean acidification. *Nat. Clim. Chang.* **2013**, *3*, 298–302. [[CrossRef](#)]
10. Lang, D.; Weiche, B.; Timmerhaus, G.; Richardt, S.; Riaño-Pachón, D.M.; Corrêa, L.G.G.; Reski, R.; Mueller-Roeber, B.; Rensing, S.A. Genome-wide phylogenetic comparative analysis of plant transcriptional regulation: A timeline of loss, gain, expansion, and correlation with complexity. *Genome Biol. Evol.* **2010**, *2*, 488–503. [[CrossRef](#)]
11. Guiry, M.D.; Guiry, G.M.; Morrison, L.; Rindi, F.; Miranda, S.V.; Mathieson, A.C.; Parker, B.C.; Langangen, A.; John, D.M.; Bárbara, I.; et al. AlgaeBase: An on-line resource for algae. *Cryptogam. Algal.* **2014**, *35*, 105–115. [[CrossRef](#)]
12. Foss, P.; Guillard, R.R.L.; Liaen-Jensen, S. Prasinoloxanthin—A chemosystematic marker for algae. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1629–1633. [[CrossRef](#)]
13. Latasa, M.; Scharek, R.; Gall, F.L.; Guillou, L. Pigment suites and taxonomic groups in Prasinophyceae. *J. Phycol.* **2004**, *40*, 1149–1155. [[CrossRef](#)]
14. Serive, B.; Nicolau, E.; Bérard, J.-B.; Kaas, R.; Pasquet, V.; Picot, L.; Cadoret, J.-P. Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171872. [[CrossRef](#)]
15. Conway, M.; Mulhern, M.; McSorley, E.; van Wijngaarden, E.; Strain, J.; Myers, G.; Davidson, P.; Shamlaye, C.; Yeates, A. Dietary determinants of polyunsaturated fatty acid (PUFA) status in a high fish-eating cohort during pregnancy. *Nutrients* **2018**, *10*, 927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Abel, S.; Riedel, S.; Gelderblom, W.C.A. Dietary PUFA and cancer. *Proc. Nutr. Soc.* **2014**, *73*, 361–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Abdelhamid, A.S.; Martin, N.; Bridges, C.; Brainard, J.S.; Wang, X.; Brown, T.J.; Hanson, S.; Jimoh, O.F.; Ajabnoor, S.M.; Deane, K.H.; et al. Polyunsaturated fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**. [[CrossRef](#)]
18. Bruno, A.; Rossi, C.; Marcolongo, G.; Di Lena, A.; Venzo, A.; Berrie, C.P.; Corda, D. Selective in vivo anti-inflammatory action of the galactolipid monogalactosyldiacylglycerol. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *524*, 159–168. [[CrossRef](#)]
19. Wang, H.; Li, Y.-L.; Shen, W.-Z.; Rui, W.; Ma, X.-J.; Cen, Y.-Z. Antiviral activity of a sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) compound isolated from the green alga *Caulerpa racemosa*. *Bot. Mar.* **2007**, *50*, 185–190. [[CrossRef](#)]
20. Blanc-Mathieu, R.; Verhelst, B.; Derelle, E.; Rombauts, S.; Bouget, F.-Y.; Carré, I.; Château, A.; Eyre-Walker, A.; Grimsley, N.; Moreau, H.; et al. An improved genome of the model marine alga *Ostreococcus tauri* unfolds by assessing Illumina de novo assemblies. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 1103. [[CrossRef](#)]
21. Yau, S.; Krasovec, M.; Benites, L.F.; Rombauts, S.; Groussin, M.; Vancaester, E.; Aury, J.-M.; Derelle, E.; Desdevises, Y.; Escande, M.-L.; et al. Virus-host coexistence in phytoplankton through the genomic lens. *Sci. Adv.* **2020**, in press.
22. Moreau, H.; Verhelst, B.; Couloux, A.; Derelle, E.; Rombauts, S.; Grimsley, N.; Van Bel, M.; Poulain, J.; Katinka, M.; Hohmann-Marriott, M.F.; et al. Gene functionalities and genome structure in *Bathycoccus prasinos* reflect cellular specializations at the base of the green lineage. *Genome Biol.* **2012**, *13*, R74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Simon, N.; Foulon, E.; Grulois, D.; Six, C.; Desdevises, Y.; Latimier, M.; Le Gall, F.; Tragin, M.; Houdan, A.; Derelle, E.; et al. Revision of the genus *Micromonas* Manton et Parke (*Chlorophyta*, *Mamiellophyceae*), of the type species *M. pusilla* (Butcher) Manton & Parke and of the species *M. commoda* van Baren, Bachy and Worden and description of two new species based on the genetic and phenotypic characterization of cultured isolates. *Protist* **2017**, *168*, 612–635. [[PubMed](#)]
24. Krasovec, M.; Vancaester, E.; Rombauts, S.; Bucchini, F.; Yau, S.; Hemon, C.; Lebredonchel, H.; Grimsley, N.; Moreau, H.; Sanchez-Brosseau, S.; et al. Genome analyses of the microalga *Picochlorum* provide insights into the evolution of thermotolerance in the green lineage. *Genome Biol. Evol.* **2018**, *10*, 2347–2365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kapon, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zianni, R.; Bianco, G.; Lelario, F.; Losito, I.; Palmisano, F.; Cataldi, T.R.I. Fatty acid neutral losses observed in tandem mass spectrometry with collision-induced dissociation allows regiochemical assignment of sulfoquinovosyl-diacylglycerols: The neutral loss of FAs from SQDGs by tandem MS. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 205–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Guella, G.; Frassanito, R.; Mancini, I. A new solution for an old problem: The regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1982–1994. [[CrossRef](#)]
28. Mimouni, V.; Couzinet-Mossion, A.; Ulmann, L.; Wielgosz-Collin, G. Lipids from microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 109–131. ISBN 978-0-12-811405-6.
29. Abida, H.; Dolch, L.-J.; Meï, C.; Villanova, V.; Conte, M.; Block, M.A.; Finazzi, G.; Bastien, O.; Tirichine, L.; Bowler, C.; et al. Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 118–136. [[CrossRef](#)]
30. Roche, S.A.; Leblond, J.D. Betaine lipids in chlorarachniophytes. *Phycol. Res.* **2010**, *58*, 298–305. [[CrossRef](#)]
31. Rivera, S.M.; Christou, P.; Canela-Garayoa, R. Identification of carotenoids using mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33*, 353–372. [[CrossRef](#)]
32. Zhang, Y.; Wu, H.; Wen, H.; Fang, H.; Hong, Z.; Yi, R.; Liu, R. Simultaneous determination of fucoxanthin and its deacetylated metabolite fucoxanthinol in rat plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 6521–6536. [[CrossRef](#)]
33. Harwood, J.L.; Guschina, I.A. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* **2009**, *91*, 679–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Degraeve-Guilbault, C.; Bréhélin, C.; Haslam, R.; Sayanova, O.; Marie-Luce, G.; Jouhet, J.; Corellou, F. Glycerolipid Characterization and nutrient deprivation-associated changes in the green picoalga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol.* **2017**, *173*, 2060–2080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Da Costa, E.; Domingues, P.; Melo, T.; Coelho, E.; Pereira, R.; Calado, R.; Abreu, M.H.; Domingues, M.R. Lipidomic signatures reveal seasonal shifts on the relative abundance of high-valued lipids from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kato, M.; Sakai, M.; Adachi, K.; Ikemoto, H.; Sano, H. Distribution of betaine lipids in marine algae. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1341–1345. [[CrossRef](#)]
37. Akimoto, S.; Tomo, T.; Naitoh, Y.; Otomo, A.; Murakami, A.; Mimuro, M. Identification of a new excited state responsible for the in vivo unique absorption band of siphonaxanthin in the green alga *Codium fragile*. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9179–9181. [[CrossRef](#)]
38. Kessler, A.; Kalske, A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2018**, *49*, 115–138. [[CrossRef](#)]
39. Wink, M. Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. In *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*; Wink, M., Ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2010; pp. 1–19. ISBN 978-1-4443-2050-3.
40. Singh, R. Chemotaxonomy: A tool for plant classification. *J. Med. Plants Stud.* **2016**, *4*, 90–93.
41. Wink, M.; Botschen, F.; Gosmann, C.; Schfer, H.; Waterman, P.G. Chemotaxonomy seen from a phylogenetic perspective and evolution of secondary metabolism. In *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*; Wink, M., Ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2010; pp. 364–433. ISBN 978-1-4443-2050-3.
42. Mc Gee, D.; Gillespie, E. The bioactivity and chemotaxonomy of microalgal carotenoids. In *Biodiversity and Chemotaxonomy*; Ramawat, K.G., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switerland, 2019; Volume 24, pp. 215–237. ISBN 978-3-030-30745-5.
43. Zimorski, V.; Ku, C.; Martin, W.F.; Gould, S.B. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, *22*, 38–48. [[CrossRef](#)]
44. Carroll, A.R.; Copp, B.R.; Davis, R.A.; Keyzers, R.A.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 122–173. [[CrossRef](#)]
45. Martin, G.J.O.; Hill, D.R.A.; Olmstead, I.L.D.; Bergamin, A.; Shears, M.J.; Dias, D.A.; Kentish, S.E.; Scales, P.J.; Botté, C.Y.; Callahan, D.L. Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103389. [[CrossRef](#)]
46. Siaux, M.; Cuiné, S.; Cagnon, C.; Fessler, B.; Nguyen, M.; Carrier, P.; Beyly, A.; Beisson, F.; Triantaphylidès, C.; Li-Beisson, Y.; et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol.* **2011**, *11*, 7. [[CrossRef](#)]
47. Vieler, A.; Brubaker, S.B.; Vick, B.; Benning, C.A. Lipid droplet protein of *Nannochloropsis* with functions partially analogous to plant oleosins. *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 1562–1569. [[CrossRef](#)]
48. Lang, I.; Hodac, L.; Friedl, T.; Feussner, I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: A comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol.* **2011**, *11*, 124. [[CrossRef](#)]
49. Galloway, A.W.E.; Winder, M. Partitioning the relative importance of phylogeny and environmental conditions on phytoplankton fatty acids. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130053. [[CrossRef](#)]
50. Taipale, S.J.; Hiltunen, M.; Vuorio, K.; Peltomaa, E. Suitability of phytosterols alongside fatty acids as chemotaxonomic biomarkers for phytoplankton. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 212. [[CrossRef](#)]
51. Wolhowe, M.D.; Prah, F.G.; White, A.E.; Popp, B.N.; Rosas-Navarro, A. A biomarker perspective on coccolithophorid growth and export in a stratified sea. *Prog. Oceanogr.* **2014**, *122*, 65–76. [[CrossRef](#)]
52. Van Mooy, B.A.S.; Fredricks, H.F. Bacterial and eukaryotic intact polar lipids in the eastern subtropical South Pacific: Water-column distribution, planktonic sources, and fatty acid composition. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2010**, *74*, 6499–6516. [[CrossRef](#)]
53. Cañavate, J.P.; Armada, I.; Ríos, J.L.; Hachero-Cruzado, I. Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* **2016**, *124*, 68–78. [[CrossRef](#)]

54. Guschina, I.A.; Harwood, J.L. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In *Lipids in Aquatic Ecosystems*; Kainz, M., Brett, M.T., Arts, M.T., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 1–24. ISBN 978-0-387-88607-7.
55. Alonso, D.L.; Belarbi, E.-H.; Fernández-Sevilla, J.M.; Rodríguez-Ruiz, J.; Grima, E.M. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 461–471. [[CrossRef](#)]
56. Abo-State, M.A.M.; Shanab, S.M.M.; Ali, H.E.A. Effect of nutrients and gamma radiation on growth and lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2019**, *12*, 332–342. [[CrossRef](#)]
57. Cañavate, J.P.; Armada, I.; Hachero-Cruzado, I. Polar lipids analysis of cultured phytoplankton reveals significant inter-taxa changes, low influence of growth stage, and usefulness in chemotaxonomy. *Microb. Ecol.* **2017**, *73*, 755–774. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
58. Tsugawa, H.; Satoh, A.; Uchino, H.; Cajka, T.; Arita, M.; Arita, M. Mass spectrometry data repository enhances novel metabolite discoveries with advances in computational metabolomics. *Metabolites* **2019**, *9*, 119. [[CrossRef](#)]
59. Marin, B.; Melkonian, M. Molecular phylogeny and classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on sequence comparisons of the nuclear- and plastid-encoded rRNA operons. *Protist* **2010**, *161*, 304–336. [[CrossRef](#)]
60. Abby, S.S.; Touchon, M.; De Jode, A.; Grimsley, N.; Piganeau, G. Bacteria in *Ostreococcus tauri* cultures — friends, foes or hitchhikers? *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 505. [[CrossRef](#)]
61. Gast, R.J.; McKie-Krisberg, Z.M.; Fay, S.A.; Rose, J.M.; Sanders, R.W. Antarctic mixotrophic protist abundances by microscopy and molecular methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *89*, 388–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Anderson, R.; Jürgens, K.; Hansen, P.J. Mixotrophic Phytoflagellate Bacterivory Field measurements strongly biased by standard approaches: A case study. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Burri, L.; Hoem, N.; Banni, S.; Berge, K. Marine omega-3 phospholipids: Metabolism and biological activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 15401–15419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Simopoulos, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 365–379. [[CrossRef](#)]
65. Cardozo, K.H.M.; Guaratini, T.; Barros, M.P.; Falcão, V.R.; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; Campos, S.; Torres, M.A.; Souza, A.O.; Colepicolo, P.; et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 60–78. [[CrossRef](#)]
66. Bowen, K.J.; Harris, W.S.; Kris-Etherton, P.M. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Are there benefits? *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **2016**, *18*, 69. [[CrossRef](#)]
67. Banskota, A.H.; Stefanova, R.; Gallant, P.; McGinn, P.J. Mono- and digalactosyldiacylglycerols: Potent nitric oxide inhibitors from the marine microalga *Nannochloropsis granulata*. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 349–357. [[CrossRef](#)]
68. Banskota, A.H.; Stefanova, R.; Sperker, S.; Lall, S.; Craigie, J.S.; Hafting, J.T. Lipids isolated from the cultivated red alga *Chondrus crispus* inhibit nitric oxide production. *J. Appl. Phycol.* **2014**, *26*, 1565–1571. [[CrossRef](#)]
69. Lopes, G.; Daletos, G.; Proksch, P.; Andrade, P.; Valentão, P. Anti-inflammatory potential of monogalactosyl diacylglycerols and a monoacylglycerol from the edible brown seaweed *Fucus spiralis* Linnaeus. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 1406–1418. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
70. Plouguerné, E.; da Gama, B.A.P.; Pereira, R.C.; Barreto-Bergter, E. Glycolipids from seaweeds and their potential biotechnological applications. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, 174. [[CrossRef](#)]
71. Kim, Y.H.; Kim, E.-H.; Lee, C.; Kim, M.-H.; Rho, J.-R. Two new monogalactosyl diacylglycerols from brown alga *Sargassum thunbergii*. *Lipids* **2007**, *42*, 395–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Gustafson, K.R.; Cardellina, J.H.; Fuller, R.W.; Weislow, O.S.; Kiser, R.F.; Snader, K.M.; Patterson, G.M.L.; Boyd, M.R. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 1254–1258. [[CrossRef](#)]
73. De Souza, L.M.; Sasaki, G.L.; Romanos, M.T.V.; Barreto-Bergter, E. Structural characterization and anti-HSV-1 and HSV-2 activity of glycolipids from the marine algae *Osmundaria obtusiloba* isolated from southeastern Brazilian

- coast. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 918–931. [[CrossRef](#)]
74. Morimoto, T.; Murakami, N.; Nagatsu, A.; Sakakibara, J. Studies on glycolipids. VII. Isolation of two new sulfoquinovosyl diacylglycerols from the green alga *Chlorella vulgaris*. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1545–1548. [[CrossRef](#)]
75. Murakami, C.; Kumagai, T.; Hada, T.; Kanekazu, U.; Nakazawa, S.; Kamisuki, S.; Maeda, N.; Xu, X.; Yoshida, H.; Sugawara, F.; et al. Effects of glycolipids from spinach on mammalian DNA polymerases. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 259–267. [[CrossRef](#)]
76. Djouani-Tahri, E.B.; Sanchez, F.; Lozano, J.-C.; Bouget, F.-Y. A phosphate-regulated promoter for fine-tuned and reversible overexpression in *Ostreococcus*: Application to circadian clock functional analysis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28471. [[CrossRef](#)]
77. Keller, M.D.; Selvin, R.C.; Claus, W.; Guillard, R.R.L. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* **2007**, *23*, 633–638. [[CrossRef](#)]
78. Winnepeninckx, B. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet.* **1993**, *9*, 407. [[PubMed](#)]
79. Hadziavdic, K.; Lekang, K.; Lanzen, A.; Jonassen, I.; Thompson, E.M.; Troedsson, C. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Madeira, F.; Park, Y.M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.R.N.; Potter, S.C.; Finn, R.D.; et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641. [[CrossRef](#)]

CHAPITRE III – APPROCHE INTEGRATIVE : DU TRANSCRIPTOME AU METABOLOME POUR COMPRENDRE LA REGULATION DES GENES SUR LE METABOLISME CELLULAIRE DANS LE CADRE DE LA RESISTANCE ANTIVIRALE.

RESUME

Ce chapitre est dédié à l'analyse des signatures métabolomiques et transcriptomiques de profils immunitaires résistants et sensibles de la microalgue *Ostreococcus mediterraneus* au Prasinovirus OmV2. Nous avons adopté une approche intégrative visant à corrélérer l'expression des gènes à l'abondance des métabolites. Ces résultats ont été mis en perspectives des mécanismes immunitaires associés à la résistance antivirale. Nous avons également pu proposer des hypothèses d'annotation pour plusieurs gènes vraisemblablement impliqués dans la mise en place de la réponse immunitaire.

1. INTRODUCTION

Les microorganismes possèdent un rôle fondamental dans l'organisation des écosystèmes marins et influencent par là le déroulement des cycles biogéochimiques (Azam, 1998). Le phytoplancton eucaryote et les cyanobactéries contribuent ensemble à plus de la moitié de la production primaire à l'échelle globale et se trouve à la base des réseaux trophiques marins (Bar-On et al., 2018). Les espèces phytoplanctoniques d'origine eucaryote les plus diversifiées et abondantes sont des microalgues rouges diatomées (Haptophyta) et dinoflagellées (Dinophyta). Par ailleurs, de récents travaux d'analyse de séquences d'échantillons environnementaux ont permis de mettre en évidence une grande distribution géographique des microalgues vertes de la classe des Mamiellophycees et leur prévalence dans la fraction picoeucaryote au niveau des zones côtières (Tragin and Vaultot, 2019). Si le phytoplancton représente la plus forte biomasse dans les écosystèmes marins il est dépassé en nombre d'un facteur dix par les virus. Si ces entités présentent souvent un spectre d'hôte spécifique (restreint) elles exercent une pression de sélection remarquable sur les microalgues

qu'elles infectent ce qui impose leur renouvellement au travers de stratégies adaptatives encore peu connues. Chez la microalgue *Ostreococcus tauri* de la classe des Mamiellophyceés on estime à 1/1000 le taux de transition d'un phénotype de susceptibilité au virus *Ostreococcus tauri* Virus 5 (OtV5) vers un phénotype de résistance (Yau et al., 2016). Le taux de mutations spontanées du génome ne permet pas d'expliquer l'émergence rapide d'un phénotype résistant au virus au sein d'une population (Krasovec et al., 2017a). La transition vers un phénotype de résistance serait induite par l'infection virale possiblement au travers de modifications épigénétiques affectant le patron d'expression des gènes et se traduisant *in fine* de manière constitutive chez la microalgue. Le génome des Mamiellophyceés affiche des caractéristiques propre à la classe et inhabituelles dans la lignée verte. En effet, ces algues présentent deux chromosomes atypiques, appelés *outliers* dont la plus petite version des deux, le SOC (Small Outlier Chromosome) est suspecté jouer un rôle crucial dans l'acquisition de la résistance antivirale (Grimsley et al., 2015; Subirana et al., 2013; Yau et al., 2016). En effet, ce chromosome héberge plusieurs gènes codant pour des méthyltransférases et glycosyltransférases impliquées dans la modification des motifs glycosidiques des constituants membranaires et son profil d'expression est très différent selon le phénotype immunitaire (Derelle et al., 2018; Yau et al., 2016). Ce chromosome héberge à lui seul près d'une centaine d'éléments transposables (20% des ETs) et sa taille est hypervariable dans les populations naturelles. Par ailleurs, son taux en GC de 50%, inférieur à celui du génome (60%), indique un taux de mutation plus élevé (Blanc-Mathieu et al., 2017). La plasticité et l'hypervariabilité génomique témoignent d'une pression de sélection supérieure sur les gènes du SOC sans doute imposée par le virus et nécessaire à l'acquisition de nouvelles stratégies immunitaires. En effet, une coévolution rapide et constante est nécessaire au sein des systèmes hôte-virus spécifiques (spectres d'hôte et de virus restreints) au risque de voir disparaître l'un des deux partenaires.

Les Prasinovirus infectant les Mamiellophyceés sont des grands virus à ADN à double brin d'environ 200 kilo bases codant plus de 200 protéines capables de produire près d'une trentaine de particules virales par cellules hôtes infectées (Derelle et al., 2008). Leurs besoins en éléments constitutifs comme les acides nucléiques, les acides aminés ou encore les lipides nécessaires à la réplication et l'assemblage viral pèsent lourdement sur le métabolisme hôte. Toutefois, les mécanismes impliqués dans le détournement métabolique hôte par le virus ne sont pas connus chez les Mamiellophyceés. Chez l'haptophyte *Emiliana huxleyi* une voie de biosynthèse de sphingolipides alternative codée par le virus EhV est exprimée lors de l'infection au dépend de celle codée par l'hôte (Ziv et al., 2016). Cette voie assure la synthèse de

sphingolipides atypiques (chaîne de base avec un nombre impaire d'atomes de carbones), dont dérivent les glycosphingolipides, des constituants essentiels de l'enveloppe du virus (Fulton et al., 2014; Mackinder et al., 2009). Par ailleurs, le virus exploite la voie hôte du mévalonate pour la biosynthèse des stérols qui sont aussi des constituants essentiels de la membrane (Rosenwasser et al., 2014). La répression de cette voie biosynthétique a été proposée comme un mécanisme de résistance chez *E. huxleyi* où une diminution drastique de la production de particules virales est observée. Les mécanismes de résistance antivirales sont complexes et semblent intervenir en plusieurs lieux : aussi bien au niveau de l'interface membranaire virus-hôte que dans le cytoplasme de la cellule déjà infectée.

Chez les Mamiellophyceés ces mécanismes demeurent inconnus. Afin de gagner en compréhension nous avons choisi d'explorer les différences qui existent d'un point de vue de l'expression des gènes et du métabolisme chez une souche résistante et une souche sensible d'*Ostreococcus mediterraneus* au virus OmV2 au cours d'une analyse temporelle sur quatre points en cycle jour/nuit (12/12). Dans un premier temps, nous avons analysé les données transcriptomiques et métabolomiques indépendamment afin d'identifier les gènes et métabolites biomarqueurs distinguant les deux souches. Dans un deuxième temps, nous avons tenté de corréliser les deux jeux de données afin d'avoir une vision intégrative des phénotypes, du gène jusqu'au métabolite. Cette double approche nous a également permis de (i) proposer une annotation pour plusieurs gènes et (ii) suggérer l'implication de certaines voies métaboliques dans le phénotype immunitaire.

2. PLAN EXPERIMENTAL

Afin d'analyser le métabolome et le transcriptome des souches résistante et sensible d'*O. mediterraneus* à quatre moments différents sur 24h nous avons construit le plan d'expérience de manière à disposer de trois flacons de 100 ml de culture de microalgue pour chaque condition. Ainsi, chacune des analyses métabolomique et transcriptomique à chaque temps de prélèvement (t_1 , t_2 , t_3 et t_4) et pour chaque souche de microalgue a été réalisée à partir d'un flacon de culture différent (**Figure 36**). Comme l'analyse métabolomique n'a pas été conduite à t_2 et t_4 , l'expérience comptabilise 36 flacons de culture.

Les points d'analyse t_1 et t_4 sont respectivement situés 2h après et 2h avant le début de la phase claire tandis que les points t_2 et t_3 sont respectivement situés 2h avant et 2h après le début de la phase sombre. Les points d'analyse t_2 et t_3 correspondent également au début et à la fin du cycle de division cellulaire d'*Ostreococcus* (Farinas et al., 2006) (**Figure 36**).

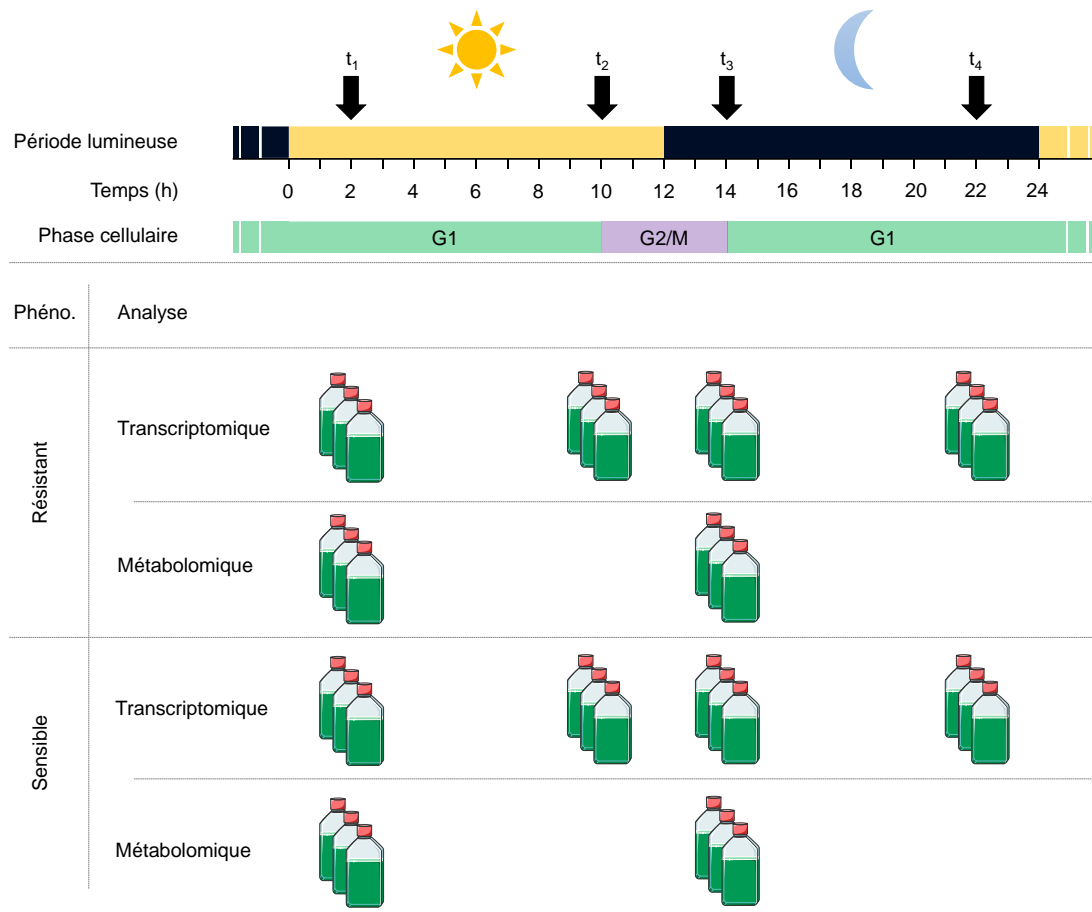


Figure 36. Schéma du plan expérimental de l'analyse transcriptomique et métabolomique d'*Ostreococcus mediterraneus* à t_1 , t_2 , t_3 et t_4 . G1 : croissance cellulaire ; G2/M : préparation à la division/mitose.

Les souches résistante et sensible d'*O. mediterraneus* présentent une parfaite synchronisation cellulaire et un taux de croissance exponentiel identique au moment des prélèvements (**Figure 37**).

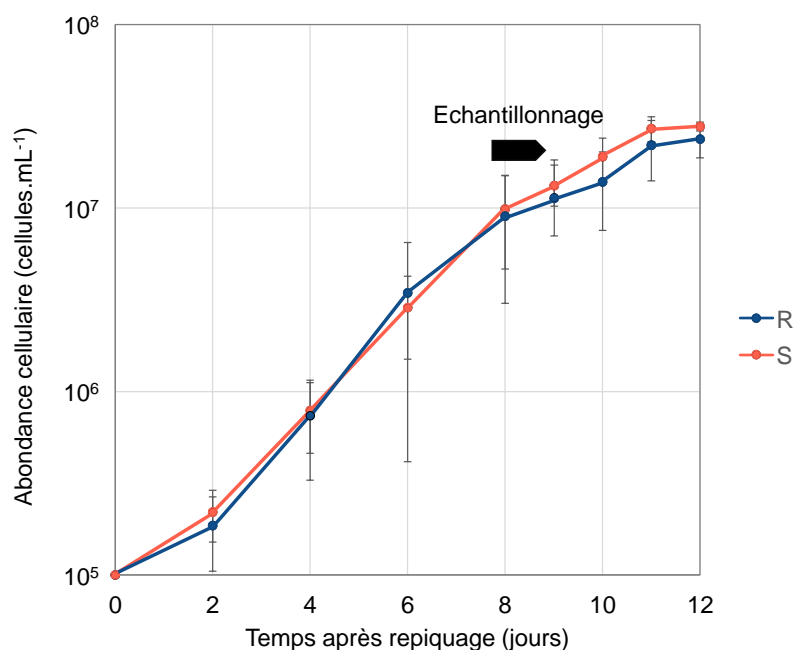


Figure 37. Cinétique de croissance de la souche résistante (courbe bleue) et sensible (courbe rouge) d'*Ostreococcus mediterraneus*. Cycle jour/nuit de type 12/12, température constante de 20°C.

3. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES PROFILS IMMUNITAIRES RESISTANTS ET SENSIBLES AU VIRUS OMV2

3.1. RESULTATS

Les vingt-quatre transcriptomes des souches résistante et sensible d'*O. mediterraneus* collectés à t_1 , t_2 , t_3 et t_4 (**Figure 36**) ont été séquencés afin d'étudier le lien entre le profil d'expression des gènes et le phénotype immunitaire.

L'Analyse en Composante Principale (ACP) révèle des profils d'expressions distincts entre souches (CP2 = 21 %) fortement marqués par le cycle cellulaire (CP1 = 64 %). En effet, les cultures échantillonnées à t_3 et t_2 , respectivement à plus et moins 2h avant le début de la phase sombre, présentent un profil d'expression très similaire entre elles mais très différent des cultures échantillonnées à t_1 et t_4 et cela quelle que soit la souche : les échantillons t_1 - t_4 et t_3 - t_2 se situent de part et d'autre de la CP1 (**Figure 38**). Les temps t_2 et t_3 pour des cultures en cycles jour/nuit 12/12 correspondent respectivement au début de la phase G2 (fin de croissance cellulaire) et à la fin de la phase M (mitose) de division cellulaire. L'interprétation de la représentation des données transcriptomiques par l'ACP au regard du cycle biologique d'*O. mediterraneus* confirme la synchronisation cellulaire des souches R et S.

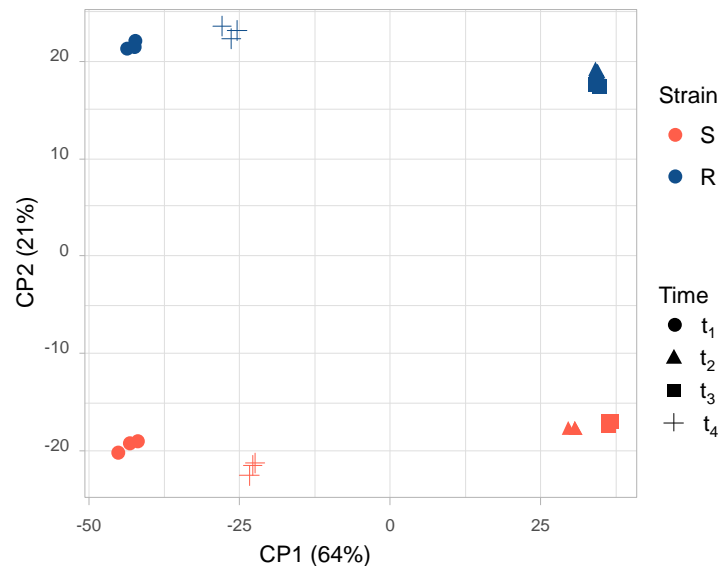


Figure 38. Analyse en composante principale du transcriptome des souches sensibles (S) et résistantes (R) d'*O. mediterraneus* à t_1 , t_2 , t_3 , et t_4 . Chaque point représente un échantillon.

L'analyse différentielle a été réalisée en comparant les souches deux à deux pour chaque temps d'échantillonnage. Au total 773 gènes sont significativement différentiellement exprimés (DEs) entre les souches R et S aux quatre temps d'échantillonnage, ce qui représente un peu plus de 10% des gènes transcrits. La variation d'expression entre souche est la plus forte à t_1 où 627 gènes sont DEs, alors qu'il y en a respectivement 280, 292 et 259 à t_2 , t_3 et t_4 (**Figure 39**). Parmi ces gènes certains ne sont DEs qu'à un temps donné : il y en a respectivement 387, 47, 44 et 21 à t_1 , t_2 , t_3 et t_4 tandis que 194 d'entre eux sont systématiquement DE à chaque temps d'analyse.

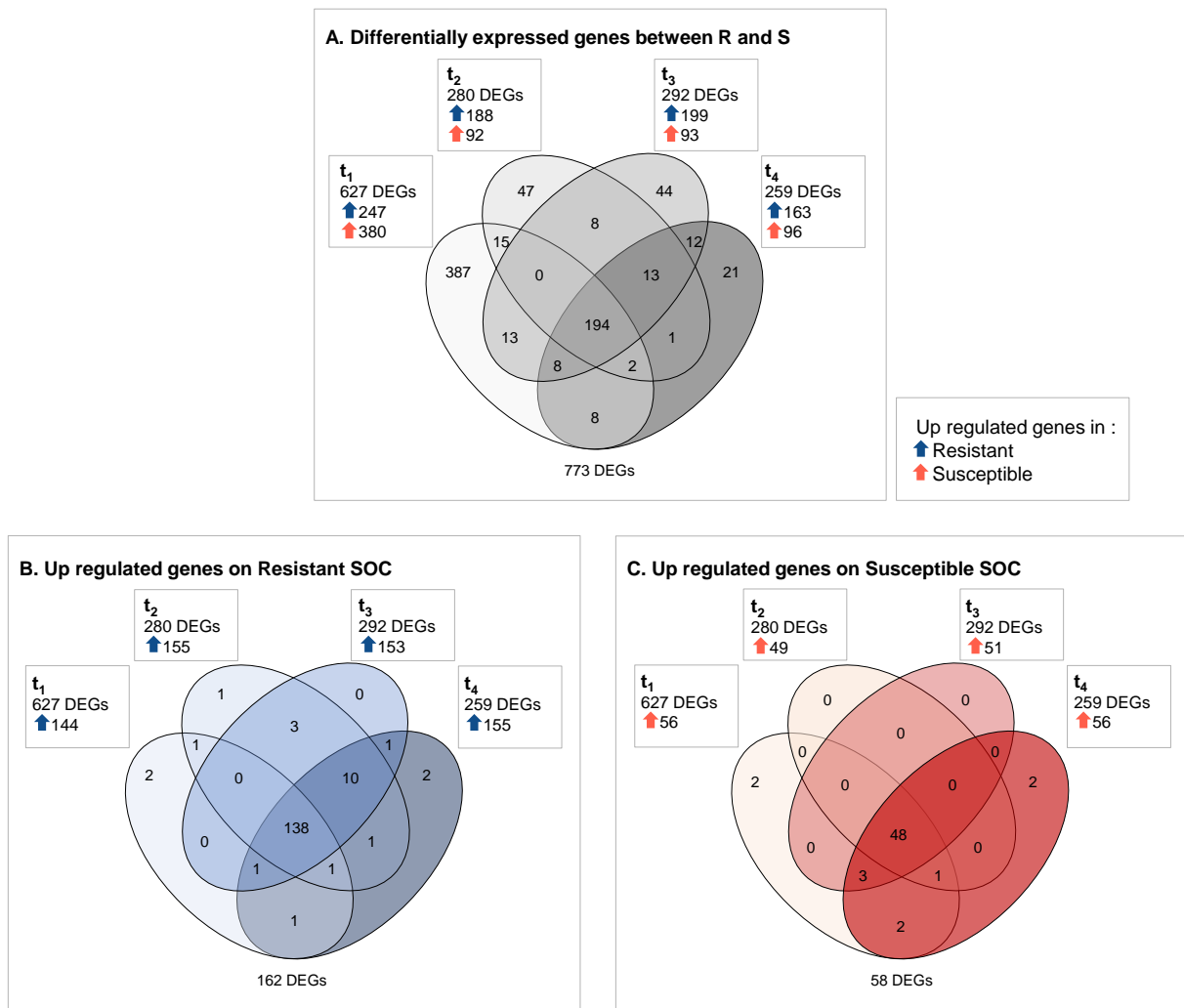


Figure 39. Diagrammes de Venn **A.** des gènes différentiellement exprimés entre la souche résistante (R) et sensible (S), **B.** surexprimés sur le chromosome SOC par la souche R et **C.** surexprimés sur le chromosome SOC par la souche S. Chaque ellipse représente un temps d’analyse, les valeurs à l’intérieur des ellipses et des zones de recouplement indiquent le nombre de gènes différentiellement exprimés propre et communs aux différents temps. DEGs : Differentially Expressed Genes ; SOC : Small Outlier Chromosome.

La distribution des 773 gènes DEs sur les 22 chromosomes génomiques est hétérogène : le petit chromosome *outlier* d’*O. mediterraneus* (SOC : Small Outlier Chromosome) capte une grande majorité (220) des gènes DEs. Cela représente la quasi-totalité des gènes transcrits du SOC (220/252) (**Figure 40**).

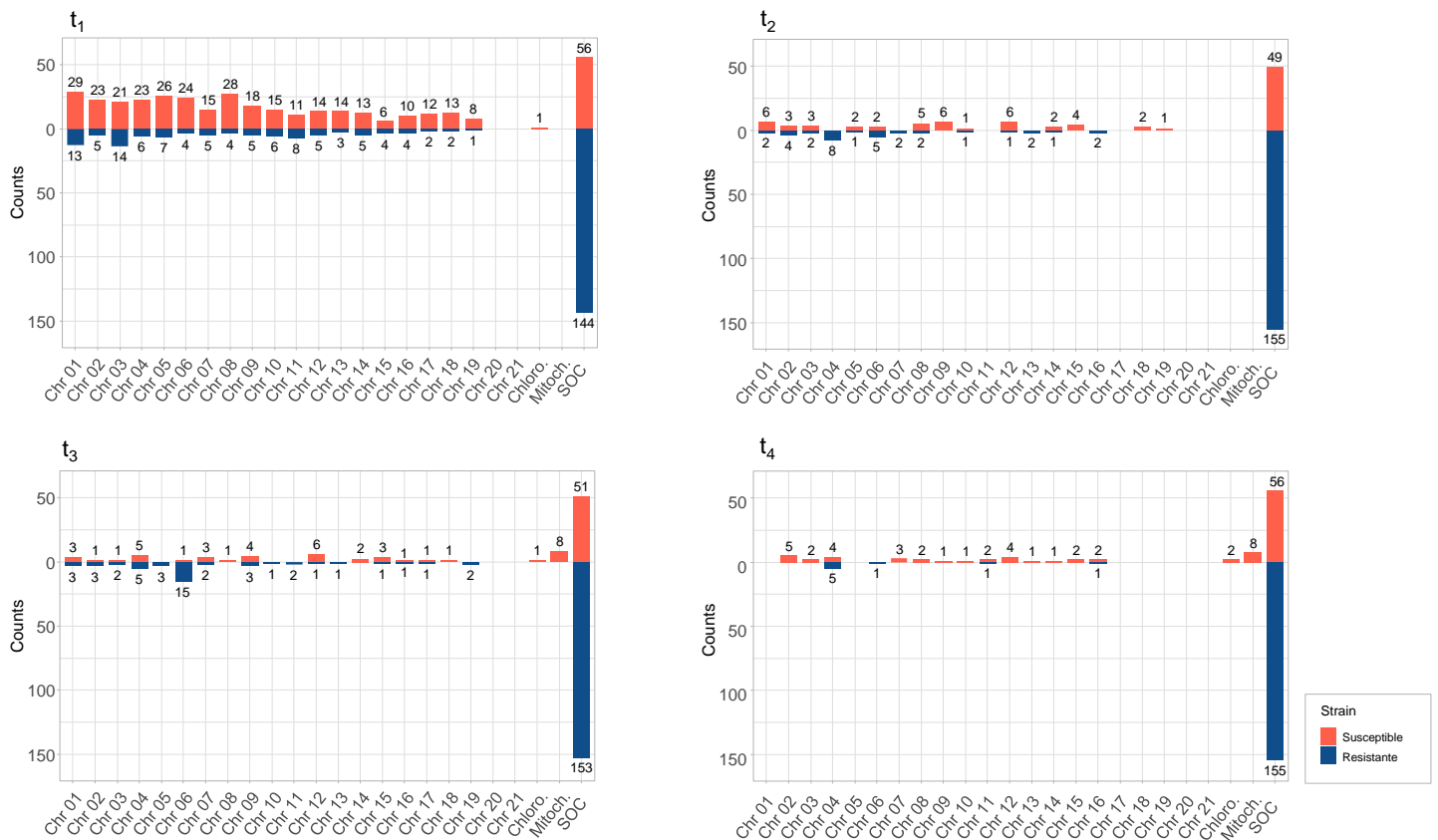


Figure 40. Histogrammes représentant le nombre de gènes surexprimés dans chaque souche par chromosome et par temps. Chr. : chromosome ; Chloro. : génome chloroplastique ; Mitoch. : génome mitochondrial ; SOC : Small Outlier Chromosome.

De manière encore plus remarquable, la répartition des gènes surexprimés dans chaque souche forme deux blocs distincts sur le SOC : une région de 105 kb contient la quasi-totalité des 58 gènes surexprimés dans la souche sensible tandis que l'autre région du chromosome rassemble les 162 gènes surexprimés par le phénotype résistant (**Figure 41**). Cette structure bipartite a été décrite chez *O. tauri*, où les gènes surexprimés par les phénotypes résistants et sensibles se trouvent sur des portions distinctes et opposées du SOC (Yau et al., 2016). Ce chromosome *outlier* a été retrouvé dans toutes les espèces de Mamiellales dont les génomes ont été séquencés à ce jour (*Ostreococcus* (Derelle et al., 2006), *Micromonas* (Worden et al., 2004) et *Bathycoccus* (Moreau et al., 2012)). Ce chromosome possède des caractéristiques atypiques comme de nombreux éléments répétés, un contenu en GC plus faible, une densité en gène inférieure comparativement aux autres chromosomes mais un taux d'expression plus fort de ceux-ci. La taille de ce chromosome est hypervariable dans les populations naturelles et fortement corrélée à l'immunité (Blanc-Mathieu et al., 2017). Le séquençage du SOC de multiples lignées résistantes et sensibles d'*O. mediterraneus* générées en laboratoire ont permis

de préciser ces observations : le passage d'un phénotype de résistance vers la sensibilité est associé à la délétion d'une portion variable mais importante du SOC (Yau et al., 2020). La souche sensible utilisée dans l'expérience présente une délétion de 58 kb, associée à la perte de sept gènes (Ostme30g02450, Ostme30g02460, Ostme30g02500, Ostme30g02683, Ostme30g02530, Ostme30g02580, Ostme30g02590). Mais dans cette expérience plus d'une centaine de gènes du SOC sont éteints ou très faiblement exprimés (expression moyenne inférieure à 10 *counts* par gène) dans la souche sensible, comme en témoignent les ratios d'expression ($\text{Log}_2(\text{fold change})$) très élevés pour les gènes surexprimés dans la souche résistante (**Figure 41**). La structure bipartite du SOC suggère une co-transcription des gènes situés dans une région ou une autre du SOC sous le contrôle de facteurs de régulations différents pour la souche sensible et pour la souche résistante.

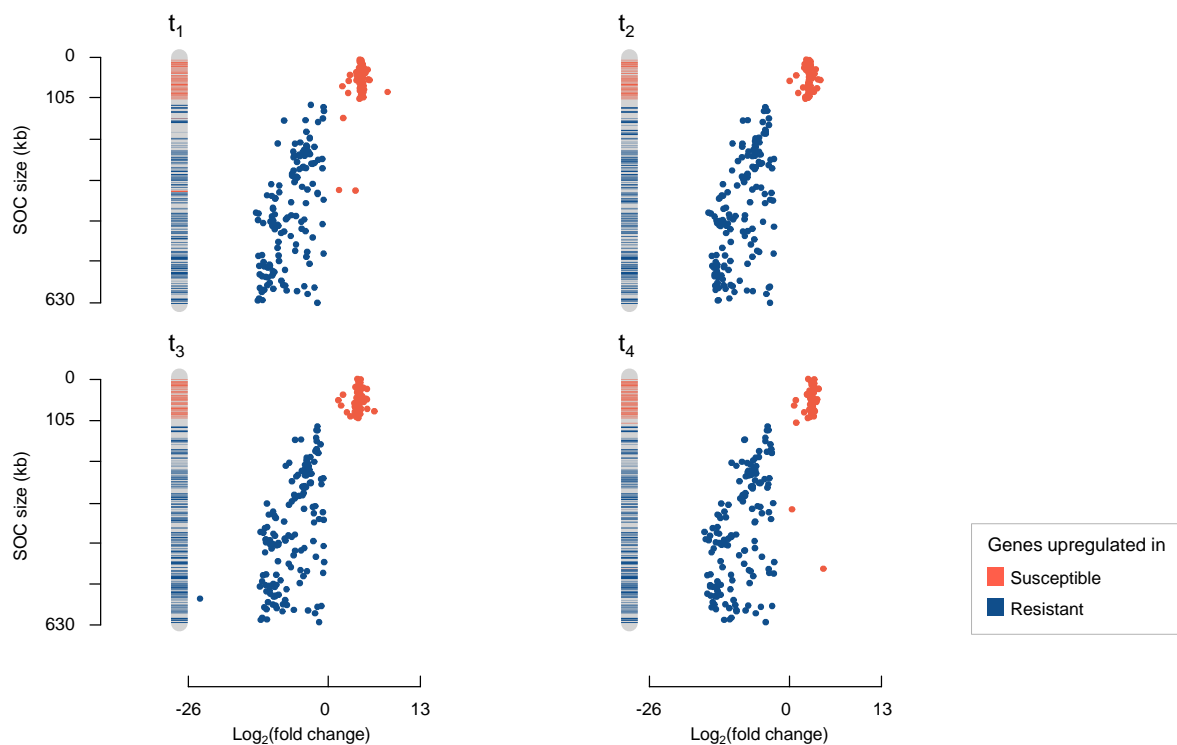


Figure 41. Distribution bipartite de l'expression des gènes sur le chromosome SOC. En rouge les gènes surexprimés dans la souche sensible, en bleu ceux surexprimés dans la souche résistante.

Analyse de la représentation des gènes codant pour des protéines membranaires

Les membranes de la cellule et des différents organites (plastides, Golgi, RE etc...) jouent un rôle essentiel dans l'interaction hôte-virus puisqu'elles sont le lieu de contact avec le pathogène mais aussi l'interface d'échange de multiples signaux de régulation constitutifs à l'infection. Ces interactions et échanges ont lieu essentiellement au travers de l'action de

protéines transmembranaires (de Armas-Rillo et al., 2016). Afin d'estimer leur nombre chez *O. mediterraneus*, le logiciel de prédiction d'hélices transmembranaires TMHMM 2.0 a été utilisé (Krogh et al., 2001). Ainsi, 1613 protéines possédant un domaine transmembranaire ont été prédites. Parmi les gènes DEs, ¼ sont transmembranaires chez le phénotype résistant alors que la proportion est plus variable (15-53 %) chez le phénotype sensible mais cette proportion n'est pas significativement différente entre les deux souches aux quatre temps d'analyse ($p_{\text{value}} = 0.3429$; test de Wilcoxon) (**Tableau 1**). Par ailleurs, les protéines transmembranaires ne tendent pas à être différentiellement exprimés par rapport aux protéines solubles dans une souche ou une autre ($p_{\text{value}} \text{ R} = 0.3429$; $p_{\text{value}} \text{ S} = 0.3429$) (**Tableau 2**).

Tableau 1. Nombre de gènes différentiellement exprimés codant pour des protéines avec un domaine transmembranaire (Trans mb.) ou des protéines solubles. La proportion relative de protéines transmembranaires par rapport à celles qui sont solubles n'est pas différent entre les deux souches ($p_{\text{value}} = 0.3429$; test de Wilcoxon).

Time	Resistant			Susceptible		
	Trans mb.	Soluble	Trans mb. / Soluble	Trans mb.	Soluble	Trans mb. / Soluble
t1	54 (21)	193	0.279	51 (30)	329	0.155
t2	34 (19)	157	0.216	28 (31)	73	0.383
t3	43 (20)	169	0.254	34 (30)	63	0.539
t4	33 (21)	132	0.25	39 (31)	75	0.52

Tableau 2. Proportion de gènes différentiellement exprimés sur le nombre de gènes totaux codant pour des protéines avec un domaine transmembranaire (Trans mb.) ou des protéines solubles. Les gènes codant des protéines transmembranaires n'ont pas tendance à être différentiellement exprimés par rapport aux gènes codant pour des protéines solubles ($p_{\text{value}} = 0.3429$; test de Wilcoxon).

Strain	Resistant		Susceptible	
p_{value}	0.3429		0.3429	
Time	Trans mb.	Soluble	Trans mb.	Soluble
t ₁	0.0335	0.0353	0.0316	0.0601
t ₂	0.0211	0.0287	0.0174	0.0133
t ₃	0.0267	0.0309	0.0211	0.0115
t ₄	0.0205	0.0241	0.0242	0.0137

Dans l'objectif d'identifier les fonctions biologiques associées aux gènes DEs des analyses d'enrichissements de domaines protéiques InterPro et de termes GO (InterPro- et GO Enrichment Analysis) ont été réalisées. Ces approches permettent d'identifier des classes de

fonctions biologiques surreprésentées dans les gènes DEs. Pour l'analyse d'enrichissement en terme GO, les fonctions biologiques (MF : Molecular Function) et les processus biologiques (BP : Biological Process) significativement plus représentés (p_{value} ajustée < 0.05 – correction de Bonferroni) présentant un facteur d'enrichissement supérieur à 2 ($\text{Log}_2\text{-Enrichment fold} > 1$) ont été retenus. De nombreux gènes n'ont pas encore d'annotation fonctionnelle, de terme GO ou IPR qui leurs sont associés ce qui restreint de fait les résultats des analyses d'enrichissement. Il a été choisi de découpler les résultats des analyses fonctionnelles des gènes du SOC des gènes des autres chromosomes car leurs fonctions et leur expression au cours du temps ne sont pas les mêmes.

Analyse fonctionnelle des gènes des chromosomes 1 à 21 (non-SOC)

À t_1 l'activité transcriptionnelle semble plus fortement induite dans le phénotype sensible. En effet, sur les 380 gènes surexprimés dans la souche sensible, 144 sont associés à ce processus biologique au travers de gènes impliqués dans la synthèse des bases pyrimidiques (GO:0006220) et de ribosomes (GO:0042254), d'enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN (GO:0006260) ou sa régulation (GO:0003676) et la régulation des transcrits (GO:0008173) (**Tableau 3A**). Les activités transcriptionnelles et traductionnelles sont accrues dans les cellules sensibles à t_1 et sont probablement associées à une augmentation du métabolisme initiant la phase de croissance et de développement des cellules. A t_2 , respectivement 3 et 4 gènes associés à la régulation des ARNs (GO:0006364) et à la synthèse de ribonucléotides (GO:0042254) sont surexprimés dans la souche résistante (**Tableau 3B**). Il existe vraisemblablement un décalage dans le temps de l'activité transcriptionnelle entre les deux souches en début de la phase claire qui se répercute en fin de phase claire. Enfin, les analyses d'enrichissement aux autres temps d'analyse ne mettent en avant aucune fonction biologique particulière.

Tableau 3A. Termes GO (*Gene Ontology*) associés aux fonctions biologiques surexprimées dans la souche sensible d'*O. mediterraneus* à t_1 .

Go term	Type	Log ₂ -Enrichment Fold	p_{value}	Nb. of genes	Subset Ratio	Description
GO:0006220	BP	3.49	1.41×10^{-03}	6	2.56%	Pyrimidine nucleotide metabolic process
GO:0042254	BP	2.77	1.01×10^{-07}	16	6.84%	Ribosome biogenesis
GO:0006260	BP	2.23	4.15×10^{-03}	11	4.70%	DNA replication
GO:0034660	BP	1.53	1.04×10^{-02}	18	7.69%	ncRNA metabolic process
GO:0008173	MF	2.11	3.07×10^{-02}	9	3.85%	RNA methyltransferase activity
GO:0008168	MF	1.32	3.96×10^{-02}	9	3.85%	Methyltransferase activity
GO:0003676	MF	0.98	8.42×10^{-08}	75	32.05%	Nucleic acid binding

Tableau 3B. Termes GO (*Gene Ontology*) associés aux fonctions biologiques surexprimées dans la souche résistante d’*O. mediterraneus* à t₂.

Go term	Type	Log ₂ -Enrichment Fold	Pvalue	Nb. of genes	Subset Ratio	Description
GO:0042254	BP	4.18	5.00×10 ⁻⁰³	4	18.18%	ribosome biogenesis
GO:0006364	BP	4.52	2.36×10 ⁻⁰²	3	13.64%	rRNA processing

Analyse fonctionnelle des gènes du SOC

Les diagrammes de Venn montrent à t₂, t₃ et t₄ que la plupart des gènes DEs entre souches sont les mêmes et majoritairement localisés sur le chromosome SOC. En effet, sur les 194 gènes systématiquement DEs, 186 (96 %) sont codés sur le SOC (**Figure 39**). Comme il n’existe pas de termes GO associés aux gènes du SOC, l’analyse fonctionnelle des gènes a été réalisée sur la base des domaines protéiques IPR. Ce travail révèle la prévalence de gènes codants pour des glycosyl transférases (GTs) dont 16 sont surexprimés dans la souche résistante et 9 dans la souche sensible soit la totalité des 28 GTs prédites sur le SOC (**Figure 42**). Chez *O. tauri* l’expression différentielle des GTs, toutes localisées sur les deux chromosomes *outliers* (BOC et SOC), a également été décrite comme un marqueur de l’immunité face au virus OtV5 (Yau et al., 2016). Toutefois, la plupart des GTs DE chez *O. tauri* et *O. mediterraneus* est différente car les gènes du SOC sont faiblement conservés d’une espèce d’*Ostreococcus* à l’autre. Seulement 11% des gènes des SOC d’*O. tauri*, *O. lucimarinus* et *O. mediterraneus* sont orthologues alors que la proportion de gènes orthologues sur les autres chromosomes est de 86% (Jancek et al., 2008). Par ailleurs, la tendance est inversée entre *O. tauri* et *O. mediterraneus* sur les gènes conservés. Alors, que les deux gènes (Ostme30g00090 et Ostme30g00120) codant pour des GTs du complexe mannosyltransférase de Golgi (Golgi mannosyltransferase complex) sont surexprimés dans la souche résistante au virus chez *O. tauri*, ils sont sous-exprimés chez *O. mediterraneus*. Chez cette dernière, les deux gènes sont groupés sur le SOC avec deux autres GTs (Ostme30g00100 et Ostme30g00110), également sous-exprimés dans la résistante, et une GDP-mannose 4,6-déhydratase (Ostme30g00130) qui assure la première étape de conversion de GDP-mannose en GDP-fucose.

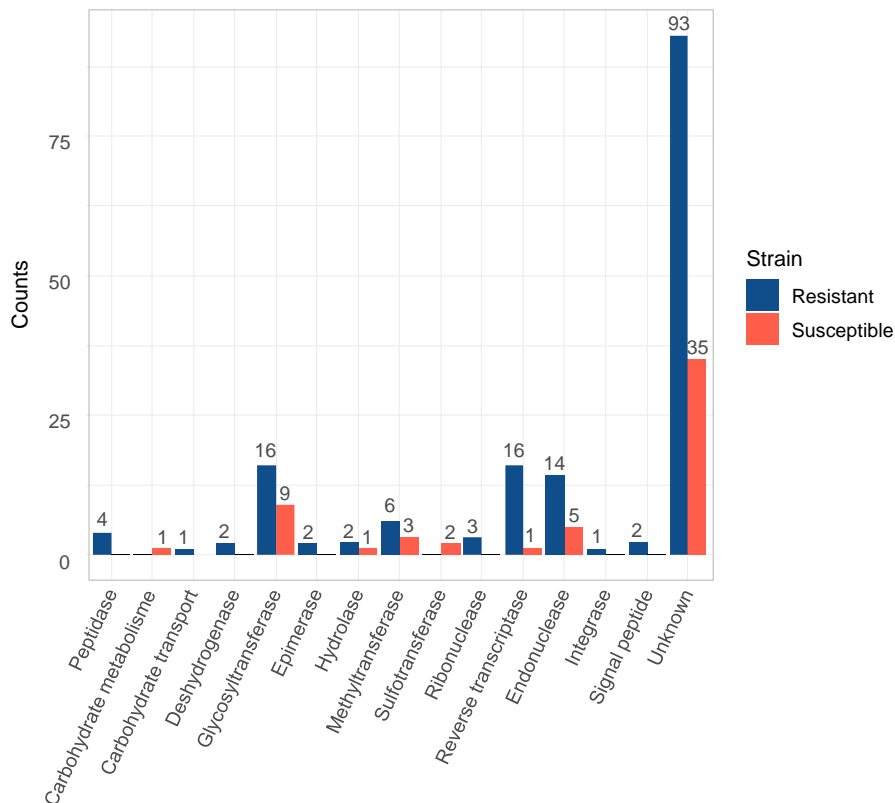


Figure 42. Histogramme des gènes différentiellement exprimés sur le chromosome SOC à t₁, t₂, t₃ et t₄. En rouge les gènes surexprimés dans la souche sensible, en bleu ceux surexprimés dans la souche résistante.

Chez les eucaryotes l'appareil de Golgi est un site central de glycosylation des protéines, de synthèse et de remodelage des polysaccharides et des protéines *N*-glycosylées (Henquet et al., 2008; Schoberer and Strasser, 2011). La *N*-glycosylation des protéines est un processus finement régulé, assuré par diverses GTs dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (RE) et est indispensable au repliement des protéines et à leur contrôle qualité. Ce système joue d'ailleurs un rôle clé dans l'immunité des plantes (Kang et al., 2015; Li et al., 2009). Chez *A. thaliana*, une délétion du gène *ALG3* codant pour une α -1,3-Mannosyltransférase localisée dans le RE confère l'immunité face au champignon pathogène *Magnaporthe oryzae* (Chen et al., 2014). En effet, le pathogène sécrète une protéine effectrice Slp1 (Secreted LysM Protein1) qui est glycosylée par l'hôte afin de supprimer la réponse immunitaire de ce dernier, mais une défection d'*ALG3* ne permet pas la glycosylation de Slp1 et assure le maintien de la réponse immunitaire hôte.

La totalité des vingt-sept gènes codant pour de potentielles GTs sur le SOC sont DEs entre le phénotype résistant et sensible, suggérant un remodelage important des différents métabolites et protéines cellulaires. Cinq gènes associés au métabolisme des glucides dont

quatre GTs surexprimés dans la souche sensible se trouvent spatialement groupés sur le SOC, probablement soumis aux mêmes facteurs de régulation et impliqués dans la même voie biosynthétique. Certaines de ces enzymes agissent possiblement sur des constituants membranaires, comme des glycanes, des polymères de sucres attachés à des protéines (glycosaminoglycanes). Une *N*-acétylgalactosamine-GT (Ostme30g00250) catalysant le transfert de *N*-acétylgalactosamine vers l'acide glucuronique β -1,3-galactose β -1-*O*-naphthalèneméthanol est surexprimée dans le phénotype sensible. Ce type de glycosaminoglycanes incorporés à la membrane peuvent constituer des sites d'ancrage viraux (Pontejo and Murphy, 2019; Salvador et al., 2013). L'expression différentielle de ces gènes peut agir en modifiant, masquant ou altérant les récepteurs membranaires d'*O. mediterraneus* utilisés par le virus OmV2 pour l'infecter. Dans certains cas les cultures résistantes d'*O. tauri* montrent une défection d'ancrage des particules virales OtV5 (Yau et al., 2016) tandis que des expériences menées avec des cultures d'*O. tauri* résistantes productrices et non productrices de virus ont pu montrer qu'il n'y avait pas de différence significative d'adsorption de particules virales entre les deux souches (Thomas et al., 2011). Il existe vraisemblablement plusieurs leviers de résistance, où les différentes GTs interviendraient à un autre moment de la réplication virale, notamment lors de l'assemblage du virion. Les besoins en sucres sont importants pour la constitution des différentes structures du virus, la membrane interne des Prasinovirus dérive de la membrane plasmique de l'hôte tandis que la capsidie protéique de PBCV-1, un virus de l'algue *Chlorella*, présente différents sites de glycosylation (Piacente et al., 2015). Les génomes des Prasinovirus comportent leurs propres GTs, certaines d'entre elles sont conservées au travers des différents génomes. Ainsi, l'expression de GTs hôte spécifiques en compétition avec des GTs virales pour leurs substrats limiterait ou empêcherait la synthèse des constituants nécessaires à la synthèse virale. Le rôle du métabolisme glucidique et des GTs a été relevé plusieurs fois dans le cadre de l'infection virale de souches Mamiellales hôtes par des Prasinovirus. Mais les gènes impliqués sont différents d'une espèce à l'autre, cela s'explique notamment par la faible conservation des gènes sur le SOC, vraisemblablement liée à un taux de mutation plus élevé sur ce chromosome. Il existe vraisemblablement de multiples stratégies de défense et d'infection employées par l'hôte et le virus qui se dessinent au travers de l'immense diversité de GTs retrouvées dans le vivant (+ 30 000) (Taujale et al., 2020) permettant des variations métaboliques infinies.

Le chromosome SOC des Mamiellales possède une forte plasticité au sein de chaque espèce. Outre sa taille variable, il est soumis à des réarrangements massifs (Yau et al., 2020).

Chez *O. mediterraneus* on retrouve plusieurs gènes pouvant créer de telles modifications. En effet pas moins de 20 endonucléases et 17 transcriptases inverse (Reverse Transcriptases – RTs) sont codées sur le SOC et toutes hormis une dans chaque cas sont surexprimées par le phénotype résistant. Les RTs permettent de générer des séquences répétées dispersées, une caractéristique du SOC d'*Ostreococcus* (Yau et al., 2016, 2020). Ces enzymes sont présentes dans la plupart des organismes eucaryotes, souvent associées aux rétrotransposons dont elles assurent la rétrotranscription. Chez *O. tauri* un rétrotransposon à LTR (Long Terminal Repeated Region) a pu être identifié sur le SOC (Yau et al., 2016), et de fait ces éléments mobiles sont vraisemblablement les séquences les plus abondamment exprimées dans le phytoplancton marin (Lescot et al., 2016). La surexpression dans la souche résistante d'une intégrase (Ostme30g00780) et de quatre protéases (Ostme30g01360, Ostme30g02080, Ostme30g02691, Ostme30g02730) pouvant assurer respectivement, l'intégration du transposon répliqué à l'ADN et la maturation des protéines de l'élément, suggère la présence d'éléments transposables dans le SOC ou ailleurs dans le génome. Ces éléments mobiles sont à l'origine de la forte plasticité des génomes et de leur adaptation environnementale (Capy et al., 2000). L'activation des éléments transposables est observée en réponse à divers stress biotiques ou abiotiques. Les rétrotransposons peuvent être constitués d'un ou plusieurs gènes ainsi que de séquences promotrices et régulatrices pouvant impacter la régulation de gènes alentours. Ainsi il a été démontré que la réponse immunitaire d'*A. thaliana* ou *N. tabacum* à différents pathogènes bactériens nécessitait l'activation préalable de rétrotransposons spécifiques induisant la transcription des gènes de défense (Melayah et al., 2001; Zervudacki et al., 2018). Lors d'une expérience d'infection d'une souche sensible d'*O. tauri* à OtV5, l'un des gènes les plus fortement transcrits se trouve être la RT vraisemblablement associée au rétrotransposon à LTR du SOC (Derelle et al., 2018) soulignant par cette expérience son importance dans la réponse immunitaire. Les changements structurels et géniques sont observés sur le SOC après infection et acquisition de l'immunité antivirale : il convient donc de penser que ces modifications puissent provenir de l'activation des gènes de la résistance et ne soient pas la cause mais une des conséquences de la mise en place de l'immunité antivirale. Toutefois, l'étude des deux systèmes hôte-virus *O. tauri*-OtV5 et *O. mediterraneus*-OmV2 révèle à chaque fois les mêmes classes de gènes surreprésentées, suggérant un rôle étroit entre la fonction de ces gènes et l'immunité antivirale.

3.2.CONCLUSION

Cette analyse différentielle des profils transcriptionnels des phénotypes résistants et sensibles d'*O. mediterraneus* à permis de mettre en évidence des gènes biomarqueurs dont le profil d'expression est caractéristique de la souche. En effet, au premier point d'analyse près de 10% des gènes varient significativement entre les deux phénotypes puis cette proportion est ramenée à moins de 3% aux autres points d'analyse. Un schéma d'expression bipartite du chromosome *outlier* SOC a pu être mis en évidence et ce de manière constitutive. Les fonctions connues codées par les gènes de ce chromosome se rapportent à la glycosylation ainsi qu'à l'expression d'éléments transposables. A ce sujet, l'expression d'un nombre élevé de réverses transcriptases par le phénotype résistant interpelle et suggère la présence de nombreux éléments transposables à travers le génome. Ceux-ci participent largement à sa plasticité et ce particulièrement en condition de stress où leur expression est généralement induite. Cette dynamique au sein du génome peut favoriser l'expression ou la répression de certains gènes pouvant jouer favorablement dans l'acquisition de défenses immunitaires par l'algue face aux virus. La conservation de nombreuses fonctions codées sur le chromosome SOC entre différentes Mamiellales mais la faible part de gènes homologues entre espèces suggère une évolution très rapide des gènes et donc des stratégies de défenses, un mécanisme décrit comme une « course à l'armement » entre le virus et son hôte. Cela se traduit dans le système Mamiellales-Prasinovirus par une spécificité d'hôte et de virus très restreinte.

4. ANALYSE METABOLOMIQUE DE PROFILS RESISTANTS ET SENSIBLES AU VIRUS OMV2

4.1. RESULTATS

Pour étudier la diversité métabolique associée à l'immunité chez *O. mediterraneus* une approche holistique non ciblée a été choisie pour couvrir un large éventail de métabolites. Les extraits d'algues à l'acétate d'éthyle ont été analysés par UHPLC-ESI⁺-HRMS², et l'analyse des chromatogrammes ioniques (TIC : *total ion chromatograms*) a été assistée par le logiciel MS-DIAL v4.16 et la base de données LipidBlast v68 afin de générer la liste des chromatogramme ioniques extraits (EIC : *Extracted Ion Chromatograms*), détecter et quantifier les ions correspondants dans le but de créer une matrice observations/variables afin de réaliser de futurs tests statistiques. Selon les paramètres de limite de détection (10^4) et d'aire sous la courbe (10^6), 2192 ions ont pu être détectés. Pour représenter la variabilité entre échantillon, une Analyse en Composante Principale (ACP) a été réalisée à partir de la matrice

observations/variables afin de comparer les profils métabolomiques des souches aux différents temps de prélèvement à l'échelle du métabolome global (**Figure 43**).

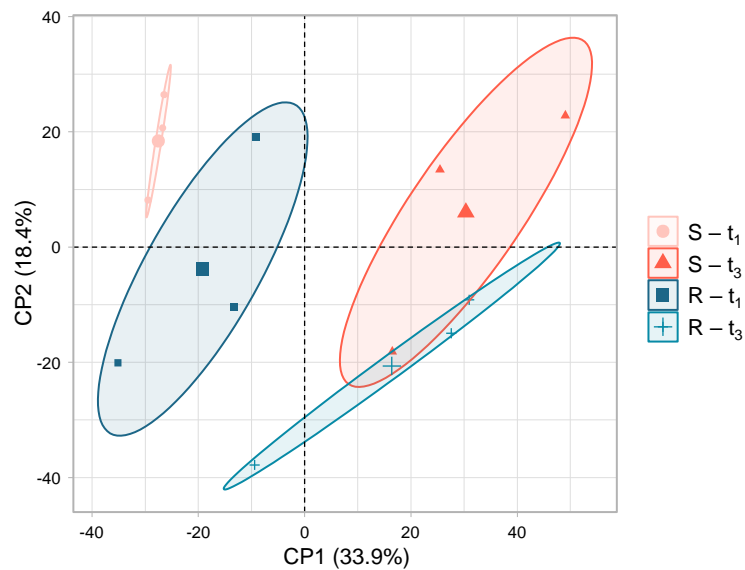


Figure 43. Analyse en composante principale du métabolome total des souches sensibles (S) et résistantes (R) d'*O. mediterraneus* à t₁ et t₃. Ellipses de confiance à 95% autour du point moyen de chaque condition.

La première Composante Principale (CP1) discrimine les échantillons sur la base du temps de prélèvement : les échantillons t₁ et t₃ se trouvent à l'opposé sur cet axe, respectivement à gauche et à droite. Plus du tiers (33.9%) de la variation du métabolome des cellules serait induit par le cycle circadien. La CP2 du jeu de données discrimine les algues plutôt d'après leur phénotype puisque pour un même temps la souche résistante se trouve sur la partie inférieure de l'axe et la souche sensible sur la partie supérieure. Cette composante exprime un peu plus de 18% de la variabilité du jeu de données. La variabilité métabolomique des deux souches est sensiblement inversée dans le temps, peu marquée pour la souche sensible à t₁ puis plus forte à t₃ et inversement pour la souche résistante.

Afin d'identifier les métabolites responsables de la variabilité entre phénotypes, un test de comparaison de moyennes non paramétrique (test de Wilcoxon-Mann-Whitney) a été réalisé sur les valeurs d'abondance de chaque ion entre les souches à un même temps de prélèvement. Les ions présentant au test une valeur-p inférieure à 0.05 ont été considérés comme significativement différenciellement abondants. Un seuil de différence d'abondance de 4 (soit 2 en valeur logarithmique de base 2) a été fixé afin de centrer l'étude sur les variations d'abondance les plus fortes. Ces deux critères de sélection ont permis d'identifier

respectivement 22 et 11 métabolites significativement plus abondants dans les souches sensible et résistante à t_1 . Tandis qu'à t_3 40 métabolites sont significativement plus abondants dans la souche sensible par rapport à la résistante mais aucun n'est plus abondant dans la résistante (**Figure 44**). Cinq métabolites, communs aux deux temps d'analyse, sont différenciellement plus abondants dans la souche sensible (**Figure 44**). Au total ce sont donc 68 métabolites qui distinguent les souches résistantes et sensibles aux deux temps d'analyses.

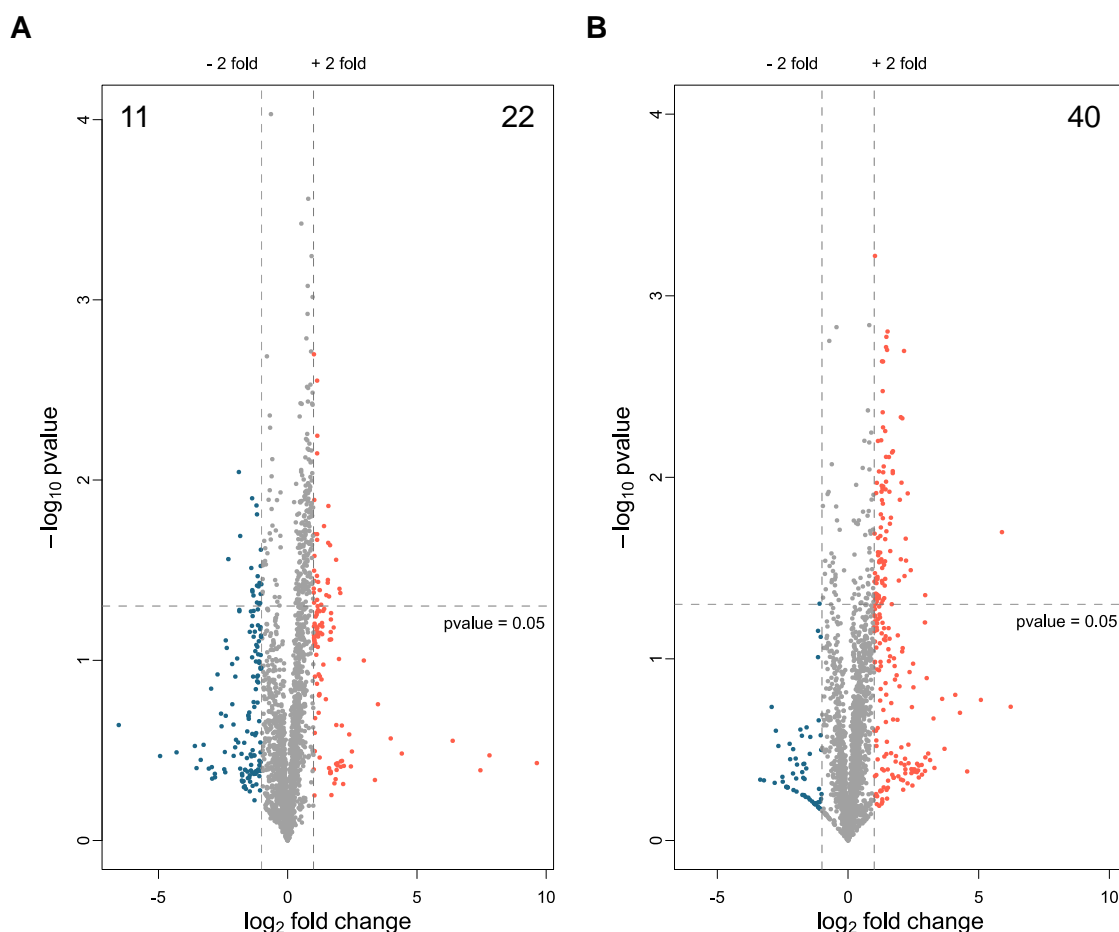


Figure 44. Volcano plots comparant les 2192 ions entre les souches d'*O. mediterraneus* résistante (bleu) et sensible (rouge) à (A) t_1 et (B) t_3 . Les valeurs dans les coins supérieurs indiquent le nombre de métabolites significativement différenciellement plus abondants dans la souche considérée par rapport à l'autre d'après les seuils choisis. Valeurs seuil : Valeur-p (p -value) = 0.05 au test non paramétrique de comparaison de moyenne de Wilcoxon-Mann-Whitney, ratio d'abondance (fold change) inférieur à -2 ou supérieur à +2.

Afin d'affiner la compréhension de cette étude comparative, les métabolites biomarqueurs ont été annotés dans la mesure du possible. Ces annotations ont été réalisées en comparant les formules brutes des métabolites (calculées à partir de la masse des ions acquise

par spectrométrie de masse à haute résolution) à des bases de données (Dictionary of Marine Natural Products et SciFinder) afin d'établir une liste de métabolites candidats, puis les spectres MS² ont été soumis à des bases de données pour comparaison (Global Natural Products Social Molecular Networking – GNPS) et élucidés pour déduire les structures supposées de ces métabolites. Huit classes de composés ont pu être dégagées (**Figure 45**) à partir des 68 métabolites étudiés (**Tableau 4A & 4B**).

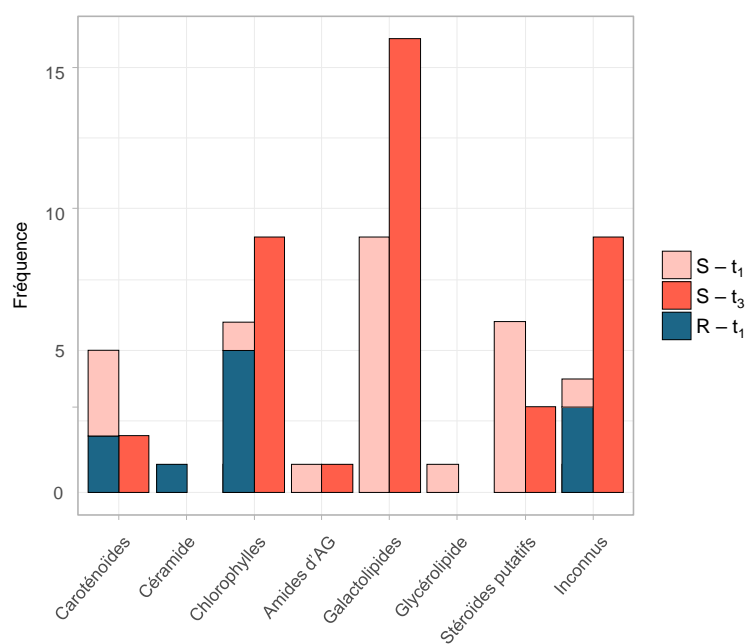


Figure 45. Histogrammes des classes de métabolites dont l'abondance est significativement différente entre les souches résistantes (R) et sensibles (S) d'*O. mediterraneus* à t₁ et t₃. AG : Acide Gras.

Tableau 4A : Métabolites dont l'abondance est significativement différente entre les souches résistantes (R) et sensibles (S) d'*O. mediterraneus* à t₁. En vert les composés dont l'abondance est également différente à t₃.

Comp.	log ₂ (ratio)	Souche	t _R (min)	m/z	Annotation	Adduit	Formule brute [M]	Spectre de MS ² disponible	Classe
1	1.14	S	2.974	341.2111	Inconnu	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	Oui	Diterpène putatif
2	1.14	S	5.255	309.2215	Inconnu	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₈ O	Oui	Diterpène putatif
3	1.04	S	5.502	298.2742	N-Acyl éthanolamine 16:1	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	Non	Amide d'AG
4	1.55	S	5.797	713.3875	MGDG 13:3-O/16:4	[M+Na] ⁺	C ₃₈ H ₅₈ O ₁₁	Oui	Galactolipide
5	1.64	S	5.818	278.248	Inconnu	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ O	Oui	Diterpène putatif
6	1.6	S	6.293	497.3243	Diacyl glycérol 26:5	[M+Na] ⁺	C ₂₉ H ₄₆ O ₅	Non	Glycérolipide
7	2.03	S	6.314	797.4443	MGDG 18:4-2O/16:4	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂	Oui	Galactolipide
8	1.03	S	6.326	795.4297	MGDG 18:5/16:4-2O	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₂	Oui	Galactolipide
9	1.87	S	6.452	797.4454	MGDG 16:3-2O/18:5	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂	Oui	Galactolipide
10	1.04	S	6.535	375.2683	Inconnu	[M+H] ⁺	Inconnue	Non	Inconnue
11	1.18	S	6.877	799.4609	MGDG 34:7-2O	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₂	Non	Galactolipide
12	1.02	S	7.155	423.3259	Inconnu isomère B1	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₄ O ₃	Oui	Stérol putatif
13	1.14	S	7.166	479.3133	Inconnu	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₃₁ H ₄₄ O ₅	Non	Stérol putatif
14	1.14	S	7.172	799.4609	MGDG 34:7-2O	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₂	Non	Galactolipide
15	1.04	S	7.314	441.3366	Inconnu isomère B2	[M+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₄ O ₃	Non	Stérol putatif
16	1.57	S	7.338	801.4765	MGDG 34:6-2O	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₂	Non	Galactolipide
17	1.14	S	7.992	739.4393	MGDG 16:4/16:3	[M+Na] ⁺	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₀	Oui	Galactolipide
18	1.24	S	9.351	733.4172	SQDG 26:0	[M+Na] ⁺	C ₃₅ H ₆₆ O ₁₂ S	Non	Sulfolipide
19	1.14	S	12.479	584.423	Epoxy-caroténoïde	[M] ⁺⁺	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	Oui	Caroténoïde
20	1.13	S	14.517	584.4227	Inconnu	[M] ⁺⁺	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	Oui	Caroténoïde
21	1.41	S	14.638	923.5172	13 ² -Hydroxychlorophylle <i>b</i> isomère 1	[M+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₀ MgN ₄ O ₇	Oui	Chlorophylle
22	1.5	S	15.311	741.509	Violaxanthine dibutyrate	[M+H] ⁺	C ₄₈ H ₆₈ O ₆	Non	Caroténoïde
23	-1.04	R	10.639	570.4433	Inconnu	[M] ⁺⁺	C ₄₀ H ₅₈ O ₂	Oui	Caroténoïde
24	-1.16	R	10.761	584.4224	Inconnu	[M] ⁺⁺	C ₄₀ H ₅₈ O ₃	Oui	Caroténoïde
25	-1.19	R	11.001	707.5042	Inconnu	[M+H] ⁺	Inconnue	Non	Inconnue
26	-1.84	R	11.115	1038.617	Dérivé de chlorophylle	[M] ⁺⁺	C ₆₁ H ₉₀ N ₄ O ₆ Zn	Oui	Chlorophylle
27	-1.04	R	13.668	538.5194	Céramide d18:1/16:0	[M+H] ⁺	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃	Oui	Céramide
28	-1.89	R	15.086	965.5987	Inconnu	[M+H] ⁺	C ₅₆ H ₈₄ O ₁₃	Non	Inconnue
29	-2.29	R	15.535	956.6257	Dérivé de chlorophylle	[M] ⁺⁺	C ₅₈ H ₈₄ MgN ₄ O ₆	Non	Chlorophylle
30	-1.36	R	16.04	938.541	15 ¹ -O-Méthyl-lactone chlorophylle <i>a</i>	[M] ⁺⁺	C ₅₆ H ₇₄ MgN ₄ O ₇	Oui	Chlorophylle
31	-1.2	R	16.048	917.5795	Dérivé de phéophytine	[M+H] ⁺	C ₅₆ H ₇₆ N ₄ O ₇	Oui	Chlorophylle
32	-1.37	R	16.05	1074.514	Dérivé de chlorophylle	[M] ⁺⁺	C ₆₉ H ₇₀ MgN ₄ O ₆	Oui	Chlorophylle
33	-1.19	R	16.052	999.5323	Inconnu	[M+H] ⁺	Inconnue	Non	Inconnue

Tableau 4B (page suivante) : Métabolites dont l'abondance est significativement différente entre les souches résistantes (R) et sensibles (S) d'*O. mediterraneus* à t₃. En vert les composés dont l'abondance est également différente à t₁.

Comp.	log ₂ (ratio)	Souche	t _R (min)	m/z	Annotation	Adduit	Formule brute [M]	Spectre de MS ² disponible	Classe
34	1.13	S	5.29	643.2036	Inconnu	[M+H] ⁺	C ₃₃ H ₃₀ N ₄ O ₁₀	Non	Inconnue
35	1.11	S	5.827	346.2719	N-Acyl éthanolamine 18:2	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₇ NO ₂	Oui	Amide d'AG
36	1.98	S	5.836	323.222	MGMG 16:4	[Mfrag+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₀ O ₉	Oui	Lyso-Galactolipide
37	1.15	S	6.138	795.4295	MGDG 16:4/18:5-2O isomère 1	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₂	Oui	Galactolipide
38	1.31	S	6.184	815.4557	MGDG 34:7-3O	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₃	Non	Galactolipide
39	1.2	S	6.19	795.4295	MGDG 16:4/18:5-2O isomère 2	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₂	Oui	Galactolipide
40	1.41	S	6.191	779.4351	MGDG 18:5-O/16:4	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₁	Oui	Galactolipide
41	1.47	S	6.285	781.4503	MGDG 18:4-O/16:4	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₁	Oui	Galactolipide
42	1.01	S	6.313	797.4446	MGDG 18:4-2O/16:4	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂	Oui	Galactolipide
8	1.09	S	6.325	795.4297	MGDG 18:5/16:4-2O	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₂	Oui	Galactolipide
43	1.33	S	6.342	779.4343	MGDG 16:4/18:5-2O	[M-H ₂ O+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂	Oui	Galactolipide
44	1.71	S	6.373	781.4505	MGDG 18:4-O/16:4	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₁	Oui	Galactolipide
45	1.69	S	6.537	407.3309	Inconnu	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₄ O ₂	Oui	Stérol putatif
46	1.3	S	6.587	783.4662	MGDG 18:3-O/16:4	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₁	Oui	Galactolipide
47	1.38	S	6.737	797.4453	MGDG 34:8-2O	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂	Non	Galactolipide
48	1.18	S	6.783	783.4661	MGDG 18:3/16:4-O	[M+Na] ⁺	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₁	Oui	Galactolipide
49	1.03	S	6.852	903.5081	DGDG 32:6	[M+Na] ⁺	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₅	Non	Galactolipide
50	1.34	S	6.865	427.3573	Inconnu	[M+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₆ O ₂	Non	Stérol putatif
51	1.56	S	6.944	621.2341	Inconnu	[M+H] ⁺	C ₃₄ H ₃₆ O ₁₁	Non	Inconnue
13	1.32	S	7.166	479.3133	Inconnu	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₃₁ H ₄₄ O ₅	Non	Stérol putatif
52	1.28	S	8.157	741.4557	MGDG 32:6	[M+Na] ⁺	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₀	Non	Galactolipide
53	1.07	S	8.935	743.471	MGDG 18:5/16:4	[M+Na] ⁺	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₀	Oui	Galactolipide
54	2.07	S	10.474	402.292	Inconnu	[M+H] ⁺	Inconnu	Non	Inconnue
55	1.37	S	11.171	539.3746	Inconnu	[M+Na] ⁺	C ₂₉ H ₅₆ O ₅ S	Non	Inconnue
19	2.28	S	12.479	584.423	Epoxy-caroténoïde	[M] ⁺⁺	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	Oui	Caroténoïde
56	1.24	S	12.662	565.4038	Inconnu	[M+H] ⁺	Inconnu	Non	Inconnue
57	1.45	S	12.911	545.4237	Inconnu	[M+H] ⁺	C ₃₁ H ₆₀ O ₅ S	Non	Inconnue
58	1.3	S	13.682	943.556	Dérivé de phéophytine	[M+Na] ⁺	C ₅₅ H ₇₆ N ₄ O ₈	Oui	Chlorophylle
49	1.35	S	13.748	559.4393	Inconnu	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₆₂ O ₅ S	Non	Inconnue
60	2.02	S	13.818	903.5635	Dérivé de phéophytine	[M+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₈	Non	Chlorophylle
61	1.05	S	13.871	653.4392	Inconnu	[M+Na] ⁺	C ₃₂ H ₆₂ O ₇	Non	Inconnue
62	2.2	S	13.905	940.52	Dérivé de chlorophylle	[M] ⁺⁺	C ₅₅ H ₇₂ MgN ₄ O ₈	Oui	Chlorophylle
63	1.02	S	13.979	990.4957	Dérivé de chlorophylle	[M] ⁺⁺	C ₅₈ H ₇₀ MgN ₄ O ₉	Non	Chlorophylle
64	2.4	S	14.472	945.4986	13 ² -Hydroxychlorophylle <i>b</i> isomère 2	[M+Na] ⁺	C ₅₅ H ₇₀ MgN ₄ O ₇	Oui	Chlorophylle
20	1.61	S	14.517	584.4227	Inconnu	[M] ⁺⁺	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	Oui	Caroténoïde
21	2.16	S	14.638	923.5172	13 ² -Hydroxychlorophylle <i>b</i> isomère 1	[M+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₀ MgN ₄ O ₇	Oui	Chlorophylle
65	1.67	S	14.951	939.511	Dérivé de chlorophylle	[M+Na] ⁺	C ₅₃ H ₇₂ MgN ₄ O ₈	Non	Chlorophylle
66	1.28	S	14.954	907.5232	Dérivé de chlorophylle	[M+Na] ⁺	C ₅₃ H ₇₂ MgN ₄ O ₆	Oui	Chlorophylle
67	1.95	S	15.337	724.5065	Inconnu	[M+H] ⁺	Inconnu	Non	Inconnue
68	1.72	S	16.638	891.5403	Dérivé de phéophytine <i>a</i>	[M+Na] ⁺	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₅	Oui	Chlorophylle

Sur les 68 métabolites différentiellement abondants la plupart (57) sont retrouvés en plus grande quantité dans la souche sensible. Ils couvrent également différentes classes chimiques, tandis que les 11 métabolites plus abondants dans la souche résistante sont essentiellement des pigments (**Figure 45**).

Les caroténoïdes

Les caroténoïdes ont pu être identifiés sur la base de patrons de fragmentation caractéristiques de cette classe de composés, dont la perte neutre de 92 Da correspondant à un toluène ou la perte neutre de 80 Da correspondant à un diméthylbutadiène pour l'époxycaroténoïde **19** (Rivera et al., 2014) (**Figures S1-4**). Les départs des groupements butanoyl de la violaxanthine (**22**) (**Figure 47**) sont caractérisés par des pertes neutres de 72 Da (**Figure S3**). Les ions **24** et **25** à m/z 570.4433 et 584.4224 correspondent à des ions fragments qui présentent un écart de 72 Da avec leurs ions parents m/z 658.4568 et 656.4313 (**Figure S6**). Toutefois, il n'est pas possible de calculer une formule brute fiable pour ces ions parents à partir de la masse haute résolution, mais leur fragmentation caractéristique permet de les associer à la classe des caroténoïdes.

Les chlorophylles

Quatorze métabolites de type chlorophylliens ont pu être identifiés, notamment grâce à la fragmentation caractéristique de la chaîne phytyle produisant une perte neutre de 278 Da en MS² (**Figures S7-17**). Au sein de cette classe on retrouve les phéophytines correspondant aux chlorophylles dépourvues de leur cation central (Mg, Zn). D'après sa formule brute le métabolite **68** a pu être identifié comme la phéophytine *a*, les métabolites **21** et **64** (**Figures S7, S15**) sont vraisemblablement deux isomères de 13²-hydroxychlorophylle *b* (Chen et al., 2015) tandis que le composé **30** est une 15¹-*O*-méthyl-lactone chlorophylle *a* (Leefmann et al., 2013; Woolley et al., 1998) (**Figure S9**).

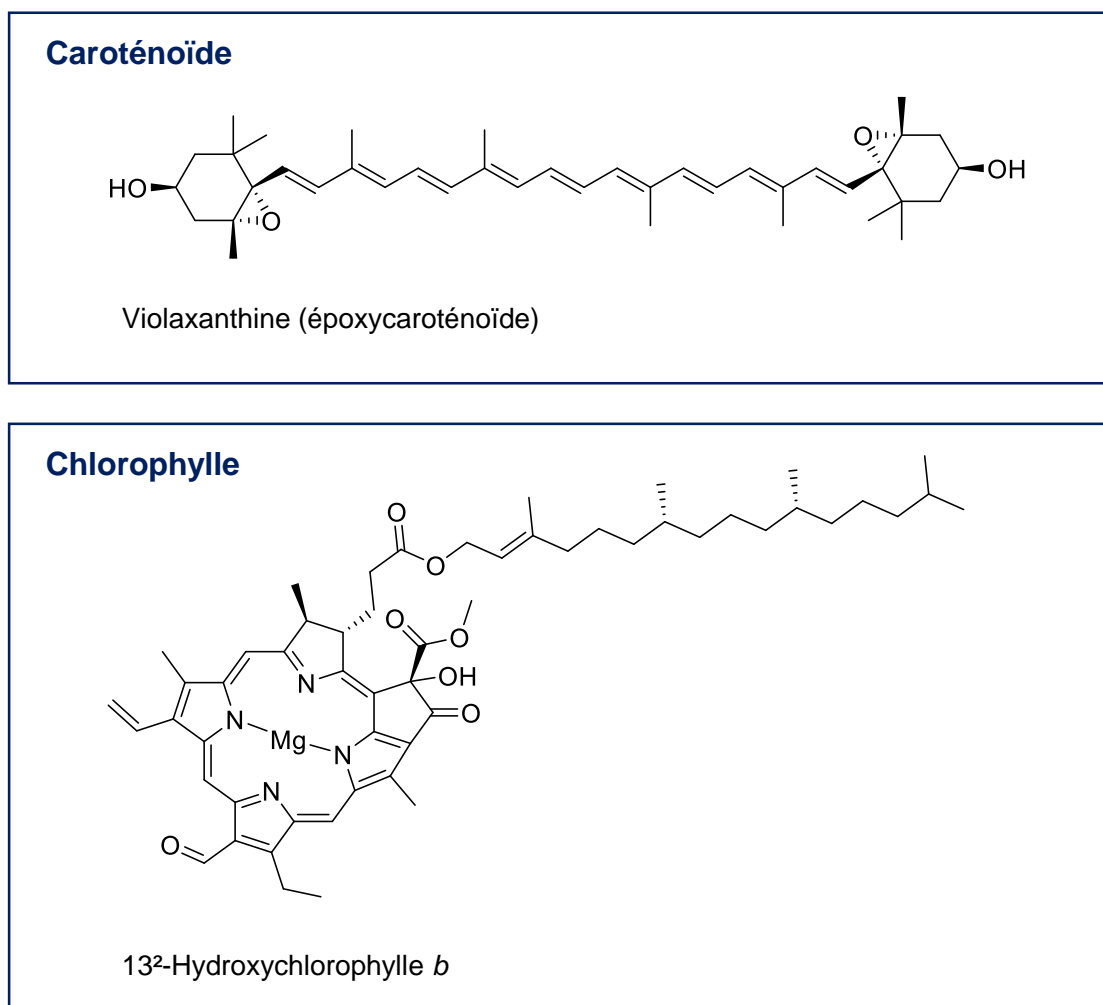


Figure 46. Structures de la violaxanthine et de la 13²-hydroxychlorophylle *b*.

Les galactolipides oxydés

Parmi les lipides polaires, on recense 21 monogalactosyl diacylglycérols (MGDGs) dont 19 pour lesquels les chaînes d'AG comportent une ou plusieurs oxydations (**Figures S18-S20**) (**Figure 47**), un monogalactosyl monoacylglycérol (MGMG, ou lyso-MGDG, composé **36**) (**Figure S21**), un digalactosyl diacylglycérol (DGDG, **49**) et un sulfoquinovosyl diacylglycérol (SQDG, **18**). La position (*sn-1/sn-2*) des chaînes d'AG sur le squelette glycérol des galactolipides a été déterminée en comparant les patrons de fragmentation en MS². Le fragment de l'adduit sodium des MGDGs résultant de la perte de l'AG en position *sn-1* ($[M+Na-R_1CO_2H]^+$) présente une intensité plus grande que celui résultant de la perte de l'AG en position *sn-2* ($[M+Na-R_2CO_2H]^+$) (Guella et al., 2003). D'autre part, d'après la littérature le galactose des MGDGs se trouve en conformation $\beta(1-3)$ tandis que les deux unités galactose des DGDGs sont en conformation $\alpha(1-6)$ et le sulfoquinovose des SQDGs en conformation

$\alpha(1-6)$ avec le squelette glycérol (Mimouni et al., 2018). La présence d'une oxydation sur la chaîne d'AG est signifiée par un O après le nombre de carbones et d'insaturation dans la formule d'abréviation (exemple : 18:4-O pour l'acide octadécatétraénoïque oxydé). L'analyse des spectres de masse ne permet pas de définir la position, ni le type de groupe fonctionnel des oxydations sur les chaînes d'AG. Toutefois, de précédentes études ont montré chez *A. thaliana* que les chaînes acyles 18:4-O et 16:4-O pouvaient respectivement correspondre à l'acide 12-oxo-phytodiénoïque (OPDA) et l'acide dinor-oxo-phytodiénoïque (dnOPDA), des acides gras contenant une structure de type isopenténone caractéristique des composés de la famille des arabidopsides. Les chaînes de type 18:3-O et 16:3-O peuvent correspondre à des céto- ou hydroxy-AG tandis que 18:2-O est en principe un AG hydroxylé. 18:3-2O et 16:3-2O peuvent correspondre à des cétoles, des hydroperoxydes d'AG ou encore des dihydroxydes d'AG (Vu et al., 2012). Ces données permettent de confirmer l'absence d'arabidopsides dans la liste des composés. Au moins cinq galactolipides comportent une chaîne avec deux oxydations (**7**, **8**, **9**, **42**, **43**). Le galactolipide **4** possède une chaîne impaire à 13 atomes de carbones en *sn*-1 et une oxydation, une longueur atypique résultant probablement de l'action d'une 13-lipoxygénase (LOX-13) et d'une hydroperoxyde lyase (HPL). Enfin au moins cinq galactolipides (**9**, **17**, **37**, **39** et **43**) possèdent une chaîne en C16 en position *sn*-1. Les chaînes acyles des galactolipides différentiellement abondants sont hautement insaturées (16:3, 16:4, 18:4, 18:5) et oxydées. Comme décrit dans la littérature, l'acide octadécapentaénoïque (18:5), acide gras polyinsaturé caractéristique des algues, est associé uniquement à l'acide hexadécatri- ou tétraénoïque (16:3 ou 16:4) sur les galactolipides (Leblond and Chapman, 2000).

A ce jour, les analyses métabolomiques ciblant les galactolipides oxydés n'ont été réalisées que sur des espèces de plantes supérieures (*A. thaliana*, *N. tabacum*). C'est dans ce contexte que des formes oxydées de MGDG 18:5/16:4-2O (**8**) ou MGDG 16:4/18:5-2O (**43**) ont pu être détectées pour la première fois (Buseman et al., 2006; Hamberg et al., 2003; Hisamatsu et al., 2003, 2005; Vollenweider et al., 2008; Vu et al., 2012). L'ensemble de ces observations montre une certaine diversité en termes de longueur et de distribution régiochimique des chaînes et d'oxydation au sein de la classe des MGDGs.

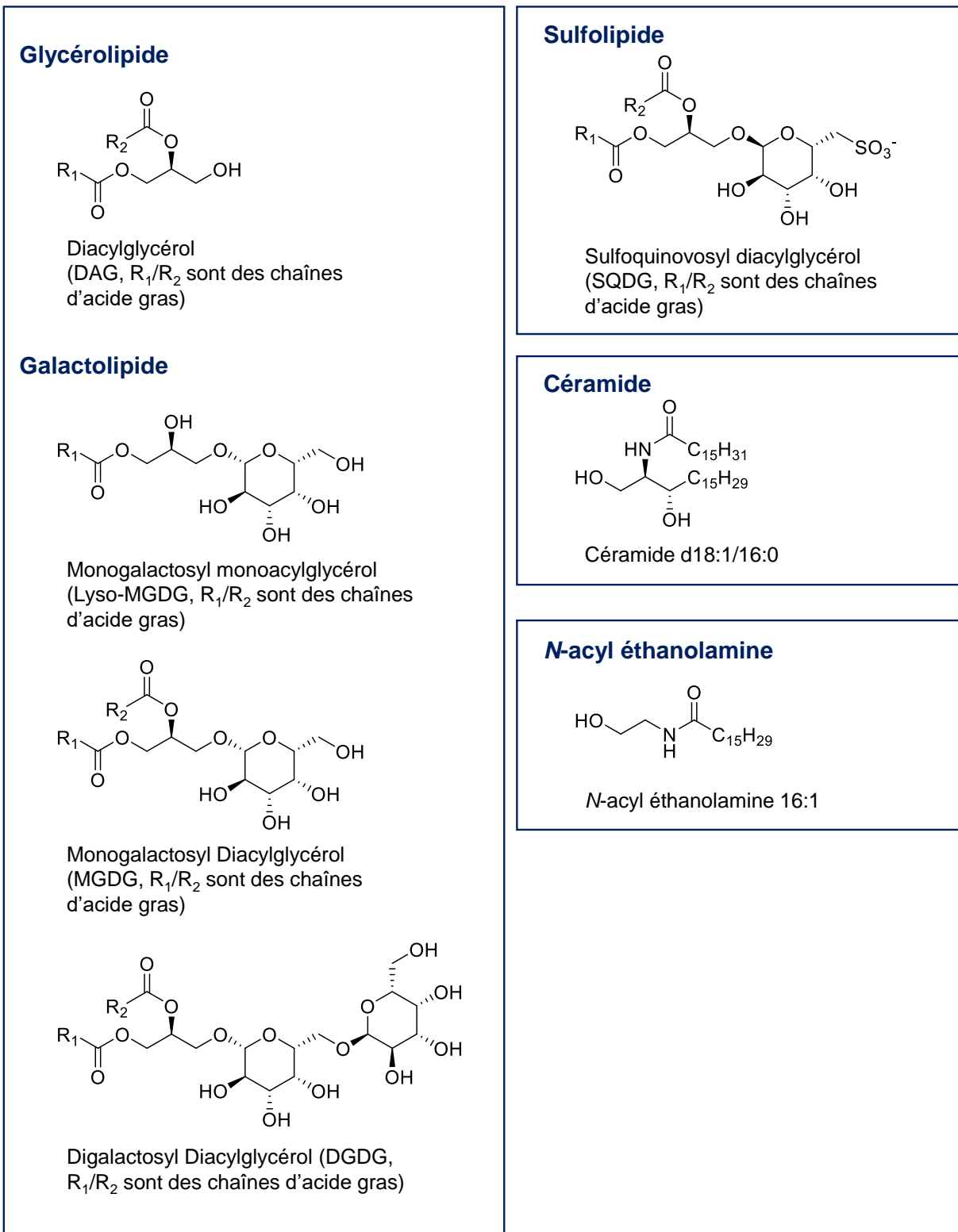


Figure 47. Structures des différentes classes lipidiques des métabolites biomarqueurs.

Les métabolites terpéniques : diterpènes et stérols

Une tentative d'annotation a été menée sur huit métabolites que nous avons associés à des dérivés diterpéniques et stérols. En effet, les ions pseudomoléculaires déshydratés des composés **45** et **50** sont connectés au sein d'un même réseau GNPS de similarité spectrale au spectre de masse de l'ion pseudomoléculaire $[M-H_2O+H]^+$ du cholestan-3-one (**Figures S24B et C**). Par ailleurs, les ions pseudomoléculaires $[M+H]^+$ des composés **12** et **15** se trouvent connectés au sein d'un même réseau GNPS avec l'adduit proton du composé **45** (**Figure S24**). La correspondance des différentes formules brutes à des composés de type stérol dans les bases de données DNP et SciFinder ainsi que la similarité spectrale avec un composé de cette classe ont permis de proposer une annotation pour ces composés.

4.2. DISCUSSION

L'analyse différentielle révèle une variation marquée des profils métabolomique au cours du temps. Cette variation est particulièrement forte pour les pigments puisque plusieurs composés chlorophylliens sont successivement plus abondants dans la souche résistante à t_1 puis dans la souche sensible à t_3 . Cette fluctuation des métabolites témoigne vraisemblablement d'une activité photosynthétique et métabolique décalées dans le temps, bien que les conditions expérimentales choisies (cycle circadien 12/12 – jour/nuit ; 20°C) assurent une synchronisation des cellules (1 division/cycle) (Farinas et al., 2006). Or, des expériences d'infections virales différées au cours de la journée menée sur *O. mediterraneus* ont révélé des cycles infectieux très différents : si l'infection intervient tôt dans la phase claire l'ensemble de la culture est lysée le jour d'après (24h) tandis qu'une infection tardive (peu avant la phase sombre) peut retarder de 48h voire plus la lyse de la culture (Derelle et al., 2018). Par ailleurs, l'étude de l'expression des gènes viraux dans des cultures infectées révèle que la transcription virale demeure quiescente durant la journée, lorsque l'activité cellulaire hôte est la plus forte, puis durant la nuit la transcription des gènes viraux est activée en même temps que quelques gènes hôtes probablement requis pour le déroulement du cycle infectieux. Ces expériences mettent en évidence l'importance du cycle cellulaire et du métabolisme de l'hôte au moment de l'infection. Une modification de ce cycle ou un léger décalage temporel de l'activité cellulaire pourraient être équivalentes, pour l'algue, à l'induction d'une réponse immunitaire qui la prémunirait du virus.

Origines biosynthétiques des galactolipides oxydés

Les galactolipides oxydés sont présents naturellement dans les plantes mais en faible quantité par rapport aux formes non oxydées. La distribution des formes oxydées de MGDGs suit généralement celles des formes non-oxydées (Vu et al., 2012). Ici, les galactolipides oxydés différentiellement abondants correspondent aux formes non-oxydées les plus abondantes retrouvées chez *O. mediterraneus* (MGDGs 18:3/16:4, 18:4/16:4, 18:5/16:4) (Degraeve-Guilbault et al., 2017; Marcellin-Gros et al., 2020). Les galactolipides oxydés les plus étudiés sont les arabidopsides pour lesquels la voie de biosynthèse proposée suppose une oxydation directe des chaînes acyles des MGDGs (Buseman et al., 2006; Chechetkin et al., 2009, 2013; Stelmach et al., 2001). Trois enzymes semblent impliquées dans le processus : une lipoxygénase (LOX) assurant l'oxydation de la chaîne acyl puis l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC) assurent la formation du la cyclopenténone caractéristique des arabidopsides. Cette voie n'implique pas l'hydrolyse des chaînes acyle, leur oxydation puis leur ré-estérification comme cela est parfois proposé (Babenko et al., 2017).

Toutefois, au moins cinq galactolipides présentent une distribution régiochimique atypique avec des chaînes acyles en C16 en *sn*-1 et C18 en *sn*-2 ; l'inverse est normalement observé. L'origine biosynthétique ne semble pas correspondre à ce qui est connu (Frentzen et al., 1983). En effet, la distribution des acide gras des glycérolipides synthétisés *de novo* est déterminée par la spécificité des acyltransférases plastidiales et microsomales en acyl-donneur et acyl-accepteur. Dans le chloroplaste, l'acyltransférase GPAT (glycérol-3-phosphate acyltransférase) qui catalyse l'assemblage de la chaîne acyle en position *sn*-1 du glycérol-3-P possède une affinité plus ou moins prononcée pour l'acyl-ACP 18:1 tandis que l'acyltransférase LPAAT (acide lysophosphatidique acyltransférase) assure le transfert d'acyl-ACP 16:0 en *sn*-2. Il en résulte une substitution *sn*-1/*sn*-2 18:1/16:0. A l'inverse, les GPATs microsomales ont une affinité accrue pour le palmitoyl-CoA (16:0-CoA) et les LPAATs microsomales possèdent une forte sélectivité pour les acyl-donneurs et acyl-accepteurs de type 18:1. Les substitutions *sn*-1/*sn*-2 privilégiées sont de type 16:0/18:0 et 18:X/18:X (X>0) dans le réticulum endoplasmique et les DAGs ainsi formés sont exportés vers le chloroplaste où ils serviront de substrat à la synthèse des MGDGs. Cette voie de biosynthèse transitant par le RE est appelée voie eucaryote et se distingue de la voie dite procaryote se déroulant exclusivement dans le chloroplaste. Les analyses lipidomiques d'*O. mediterraneus* confortent l'origine procaryotique des galactolipides même si un MGDG 16:4/16:4 minoritaire a pu être détecté chez *O. tauri* par exemple (Degraeve-Guilbault et al., 2017; Marcellin-Gros et al., 2020). L'algue verte *Chlorella*

kessleri est la seule espèce pour laquelle la contribution de la voie eucaryote dans la synthèse de galactolipides a été démontrée. Cette voie semble davantage partagée par les organismes photosynthétiques supérieurs (Sato et al., 2003). Chez *O. tauri* seule une GPAT plastidiale a pu être inférée bioinformatiquement (Misra et al., 2012) et l'analyse de plusieurs génomes de microalgues n'a pas permis de détecter de LPAATs d'origines microsomaux chez celles-ci (Misra et al., 2014). L'origine biosynthétique des galactolipides chez *Ostreococcus* serait strictement procaryotique. Toutefois, l'annotation informatique automatique des gènes ne définit jamais avec certitude leurs fonctions. Par ailleurs, les études des spécificités de substrat des enzymes GPATs et LPAATs proviennent d'organismes évolutivement distants, et il est possible que les enzymes d'*O. mediterraneus* possèdent une sélectivité moins stricte expliquant la distribution de chaînes acyles différents sur les galactolipides. Cette hypothèse serait compatible avec l'action de lipoxygénases agissant directement sur les chaînes acyles des MGDGs générant des galactolipides oxydés. La voie alternative impliquerait une édition des chaînes acyles, c'est-à-dire un transfert des chaînes acyles d'une position à une autre du galactolipide ou un échange avec un pool de chaînes d'acides gras (acyl-CoA), un mécanisme similaire au cycle de Lands se déroulant dans le RE. Déterminer dans un premier temps la spécificité de substrat des GPATs et LPAATs plastidiale permettrait de mieux appréhender les voies impliquées dans la synthèse de ces galactolipides.

Rôles biologiques des galactolipides oxydés

Ces composés sont naturellement présents dans les cellules de plantes en faible quantité, mais différents stress peuvent induire leur accumulation (pathogènes, herbivores, température, salinité). Les arabidopsides forment la classe de galactolipides oxydés la mieux décrite et la plus étudiée biologiquement, car ils sont impliqués dans la synthèse et sont une forme de stockage de l'acide jasmonique (JA), une phytohormone cruciale dans l'établissement de la réponse immunitaire. L'accumulation de galactolipides oxydés durant un stress est souvent associée à la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Ces mécanismes ont été largement étudiés chez l'humain pour lequel l'oxydation des lipides membranaires (essentiellement phospholipides) peut médier de nombreuses réponses aussi bien bénéfiques que délétères en ciblant de multiples récepteurs membranaires protéiques : inflammation, apoptose ou encore réponse immunitaire (Hazen, 2008; Karki and Birukov, 2020; Philippova et al., 2014).

Chez les plantes, l'oxydation des lipides membranaires peut servir à prévenir l'oxydation et l'altération du contenu cellulaire en captant les espèces réactives de l'oxygène généré par une attaque pathogène (Mène-Saffrané et al., 2009). Le rôle des lipides

membranaires oxydés libres a été décrit. Ces composés agissent notamment comme des régulateurs transcriptionnels de réponse immunitaire comme la réponse hyper sensible chez les plantes (Sattler et al., 2006; Zoeller et al., 2012). Sous l'action de lipases les AG oxydés peuvent être libérés et servir à la transduction d'un signal. Par ailleurs, les galactolipides oxydés peuvent présenter des activités biologiques intéressantes par rapport à leurs lipides libres équivalents : l'activité bactéricide de l'arabidopside E (MGDG 18:4/18:4-O/16:4-O) est supérieure à celle de l'OPDA seule (Andersson et al., 2006).

Les galactolipides oxydés sont généralement des métabolites présents en faible quantité par rapport à leurs homologues non-oxydés. Ils peuvent jouer un rôle de régulation très fin dans la réponse à un stress en ciblant des récepteurs spécifiques. Une régulation fine de leur abondance dans la cellule peut ainsi avoir un impact direct sur la réponse induite face au stimulus. L'absence de profilage de galactolipides oxydés chez les algues ou même les plantes lors d'infections virales ne permet pas d'avoir d'éléments de comparaisons ni de compréhension du rôle de cette classe de métabolites dans l'interaction hôte-virus. Ainsi, de futurs travaux cherchant à estimer l'effet de ces composés et comprendre la régulation des gènes qui leurs sont associés permettraient de définir plus clairement le rôle de ces composés dans le phénotype immunitaire d'*O. mediterraneus*.

Les stérols

Dans ce travail, 9 composés de type stérols sont plus abondants dans la souche sensible. Bien qu'ils ne soient annotés qu'au niveau de la classe, ces composés dérivent vraisemblablement des stérols canoniques connus chez les plantes (campésterol, sitostérol, stigmastérol). Le rôle des stérols dans le fonctionnement des membranes est largement reconnu. En plus de leur rôle structurel essentiel, ils peuvent être impliqués dans des processus très spécifiques tels que la transduction de signaux cellulaires, la régulation de cascades de gènes, ou encore la reconnaissance hôte-virus (Ketter and Randall, 2019). Pour la première fois dans le cadre d'une interaction algue-virus leur implication a été décrite au sein du modèle *E. huxleyi*-EhV (Rosenwasser et al., 2014). L'analyse lipidomique révèle une déplétion de plusieurs stérols chez l'hôte lors de l'infection parmi lesquels : l'épibrassicastérol et des isomères d'ergostatriènes $\Delta^{5,22}$ et de l'ergostadiène. De fait, deux de ces composés se trouvent être également des constituants de la membrane interne du virus. L'hypothèse de l'utilisation des stérols hôtes par le virus pour la constitution de la membrane virale a été validée en utilisant des inhibiteurs des voies de biosynthèse des précurseurs des stérols chez l'hôte. Ainsi, chez *E. huxleyi* le blocage de la voie cytosolique du mévalonate (MVA) conduit à une déplétion en

stérols et une diminution drastique de production de particules virales par l'hôte. Cette stratégie semble employée par plusieurs virus : le virus du Nil Occidental (WNV : West Nile Virus) module l'activité de biosynthèse du cholestérol chez l'humain en induisant une surexpression des gènes de la voie de biosynthèse au moment de l'assemblage des particules virale (Mackenzie et al., 2007). La régulation de la voie de biosynthèse des stérols est une étape critique pour la production et la libération de certains virus. La réduction de la synthèse de cholestérol au travers d'une boucle de régulation à interféron est une stratégie de défense chez l'humain face à l'infection par le cytomégalo virus (Blanc et al., 2011). La souche sensible d'*O. mediterraneus* tend à produire plus de certains stérols, il est possible que ces composés soient des constituants de la membrane virale. Pour cela il serait nécessaire d'identifier les stérols du virus OmV2 et les comparer avec les stérols des profils immunitaires résistant et sensibles hôtes. Il serait alors possible de conclure quant à l'éventuel rôle de ces composés dans l'immunité de la microalgue face à son virus.

Le céramide

Le céramide d18:1/16:0 dérive de la voie Δ^4 -désaturase puisqu'elle comporte une insaturation et seulement deux hydroxylations sur la LCB. Cette voie n'est pas majoritaire chez les plantes où la voie des C4-hydroxylase est préférée. La distinction entre la souche sensible et résistante se fait donc sur un métabolite issu d'une voie secondaire. Comme les stérols, les céramides et leurs dérivés (sphingolipides et céramides glycosylées, estérifiées etc...) sont des constituants essentiels des membranes eucaryotes en plus d'être des molécules de signal dans plusieurs voies du métabolisme (Aguilera-Romero et al., 2014). Par ailleurs, les céramides jouent un rôle dans la régulation du cycle de vie de nombreux pathogènes dont les virus, notamment parce qu'ils sont des constituants membranaires essentiels de ceux-ci (Brugger et al., 2006; Hanada, 2005; Sakamoto et al., 2005; Ziv et al., 2016). L'importance des céramides a récemment été relevée dans le couple hôte-virus *E. huxleyi*-EhV. En effet, le génome viral code pour une voie de biosynthèse alternative des céramides. Cette caractéristique est fréquente dans les génomes viraux qui comportent de nombreux gènes dits auxiliaires (ou vAMGs : virus Auxiliary Metabolic Genes) qui s'ajoutent ou se substituent aux gènes hôte lors de l'infection afin d'étendre les capacités métaboliques du *virocell* (virus + hôte infecté) (Enav et al., 2014). L'enzyme précurseur, une Sérine Palmitoyl-CoA Transférase (SPT), de la voie des céramides codée par EhV possède une affinité de substrat différente de la SPT hôte : préférant le pentadecanoyl-CoA (C15) au palmitoyl-CoA (C16). Il en résulte des céramides avec une LCB plus courte à 17 atomes de carbone. Par la suite, la LCB est successivement hydroxylée sous

l'action d'hydroxylases hôte et virales. Cette voie métabolique codée par le virus est essentielle pour l'assemblage des particules et l'infectivité des nouveaux virus. Si l'infection virale induit de profonds changements métaboliques généraux chez l'hôte, certaines voies métaboliques comme celle des céramides semblent faire l'objet d'une régulation fine et orientée vers la synthèse de métabolites spécifiques. Au travers de ces gènes auxiliaires de nombreuses fonctions cellulaires peuvent être modifiées chez l'hôte, comme la photosynthèse (Sharon et al., 2009), la voie des pentoses phosphates (Thompson et al., 2011), la régulation du phosphate ou du NO (Thompson et al., 2011), la synthèse de polysaccharides (DeAngelis et al., 1997) ou la dégradation d'ADN hôte (Yutin and Koonin, 2009). Chez les Prasinovirus de telles voies de biosynthèse auxiliaires complètes n'ont pas été décrites mais plusieurs gènes liés au métabolisme des sucres et des lipides sont retrouvés (Yau et al., 2020). Les besoins spécifiques du virus peuvent être un levier de résistance pour l'hôte s'il modifie judicieusement son métabolisme. C'est aussi un enjeu adaptatif pour le virus qui est sélectionné sur sa capacité à exploiter le métabolisme de son hôte. La présence de vAMGs renforce le concept en évolution de *course à l'armement* où la coexistence des hôtes et de leurs virus repose sur l'acquisition par les deux parties de nouvelles stratégies métaboliques.

5. L'APPROCHE INTEGRATIVE DU TRANSCRIPTOME AU METABOLOME : COMPRENDRE COMMENT SE TRADUIT LA REGULATION DES GENES SUR LE METABOLISME CELLULAIRE

Les métabolites sont issus de l'action d'enzymes codées par le génome. La dynamique et l'abondance des métabolites dans la cellule dépendent donc de l'expression des gènes codant pour ces enzymes et les facteurs de régulations associés. L'analyse combinée des données transcriptomiques et métabolomiques a été réalisée dans le but d'explorer ce lien gène-métabolite et de déterminer le niveau de corrélation entre les deux niveaux d'expression. Toutefois, les gènes considérés dans l'analyse d'expression différentielle du paragraphe précédent ne sont pas impliqués dans le métabolisme des composés différentiellement représentés entre le phénotype résistant et sensible et de ce fait ne peuvent pas être corrélés à ces derniers. Nous avons changé notre approche comparative en considérant directement les gènes impliqués dans le métabolisme (voies de biosynthèse et de dégradation) des composés biomarqueurs du phénotype afin de tester s'ils étaient différentiellement exprimés. Nous avons fait le postulat que le seuil de variation d'expression différentielle précédemment fixé à ± 4 (Log_2 fold change ≥ 2 ou ≤ 2) était trop drastique et que les variations d'abondance de métabolites entre souche reposaient sur une variation d'expression plus faible des gènes. Nous

avons donc considéré qu'il y avait une corrélation entre l'expression du/des gènes de la voie métabolique et l'abondance du métabolite lorsque (i) le gène est significativement différentiellement exprimé entre les deux phénotypes immunitaires (valeur- p ajustée < 0.1) sans limite de seuil et (ii) les variations d'expression du gène et d'abondance du métabolite sont congruentes (**Figure 48**).

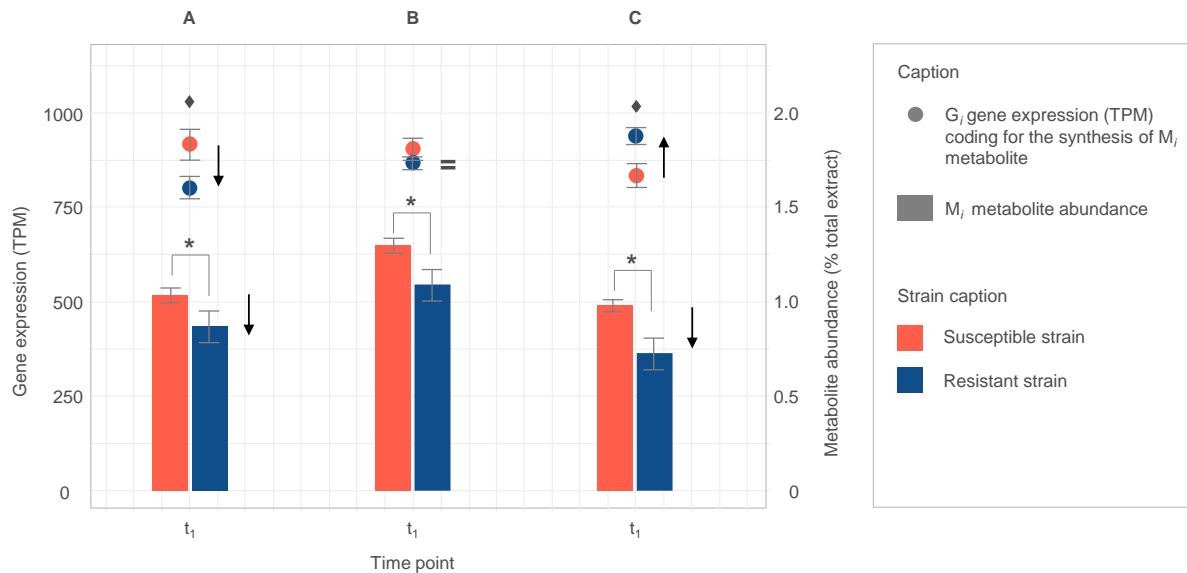


Figure 48. Illustration du principe de lien expression d'un gène-métabolite. **A.** Congruence entre l'expression d'un gène et l'abondance du métabolite codé par ce même gène. Les flèches orientées dans la même direction indiquent une congruence. Absence de congruence entre l'expression du gène et l'abondance du métabolite, **B.** dû à l'absence d'expression différentielle du gène entre les souches ou, **C.** dû à une variation opposée de l'expression du gène et de l'abondance du métabolite entre les souches (direction des flèches opposée). Les points correspondent aux valeurs d'expression du gène en transcrits par millions (TPM) et les histogrammes représentent les valeurs d'abondance relative du métabolite par rapport à l'extrait total.

Nous souhaitons voir au travers de cette approche intégrative si nous pouvons détecter une coordination rapide de la transcription, de la traduction et de la réaction enzymatique à l'origine de la synthèse du métabolite biomarqueur. Les résultats seront mis en perspective avec les phénotypes immunitaires afin de discuter leur rôle dans l'immunité antivirale.

Au regard des résultats de l'analyse métabolomique, trois voies métaboliques ont été ciblées : celle des galactolipides, des céramides, et enfin celle des stérols végétaux.

Les voies métaboliques présentées sont principalement inférées des voies décrites chez les espèces modèles *A. thaliana* et *C. reinhardtii*. La liste des gènes impliqués dans ces voies

métaboliques a été compilée manuellement à partir (i) des données d'annotation du génome d'*O. mediterraneus*, (ii) de la recherche de domaines protéiques caractéristiques (domaines interpro IPR et Pfam), (iii) de la littérature et (iv) et de la recherche de gènes orthologues à partir de plusieurs espèces modèles. Pour cela les bases de données ORCAE (Sterck et al., 2012) et PLAZA (Van Bel et al., 2018) ont été utilisées pour la recherche de gènes et domaines protéiques chez *O. mediterraneus*, les bases de données KEGG (Kanehisa, 2019) et PlantCyc (Schlöpfer et al., 2017) ont été choisies pour la recherche de gènes orthologues caractérisés chez *O. tauri*, *O. lucimarinus*, *A. thaliana* et *C. reinhardtii*, complétées de la base TAIR (The Arabidopsis Information Resource) (Berardini et al., 2015) pour les gènes orthologues caractérisés chez *A. thaliana*.

5.1. LIEN GENE-METABOLITE : PREUVE DE CONCEPT

Préalablement à l'étude du lien entre l'expression des gènes et les différentes classes de métabolites nous tenions à mettre en évidence le principe de congruence au travers d'un exemple explicite en lien avec la voie de biosynthèse des galactolipides. La monogalactosyl diacylglycérol synthase (MGDS) est l'enzyme qui catalyse la synthèse des galactolipides précurseurs MGDG 18:0/16:0 et 18:1/16:0 par ajout d'un galactose sur les deux diacylglycérols (DAG) 18:0/16:0 et DAG 18:1/16:0 (**Figure 49**). Les autres MGDGs 18:X/16:X sont synthétisés par déshydrogénation successives sous l'action de désaturases à partir de ces galactolipides précurseurs. Le DAG 18:1/16:0 est plus abondant dans le chloroplaste vu l'affinité préférentielle de la GPAT pour l'acide octadécénoïque (18:1). Nous avons donc choisi l'étape catalysée par la MGDS pour illustrer notre raisonnement. En effet, nous avons pu identifier sans ambiguïté le gène *MGDS* et les produits des réactions qu'il catalyse. Par ailleurs, l'analyse multivariée du jeu de données métabolomiques révèle la forte contribution des MGDGs aux composantes 1 et 2 de l'ACP suggérant le caractère discriminant de ces composés dans le temps et entre phénotypes de microalgues (**Figure 50**).

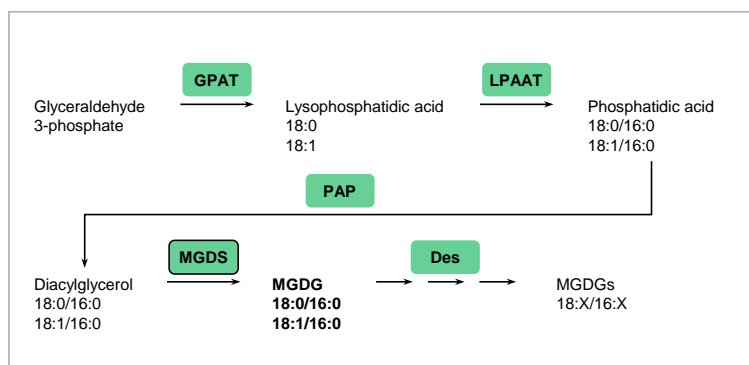


Figure 49. Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des galactolipides. Des : désaturase ; GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase ; LPAAT : acide lysophosphatidique acyltransférase ; MGDS : monogalactosyl diacylglycérol synthase ; PAP : acide phosphatidique phosphatase.

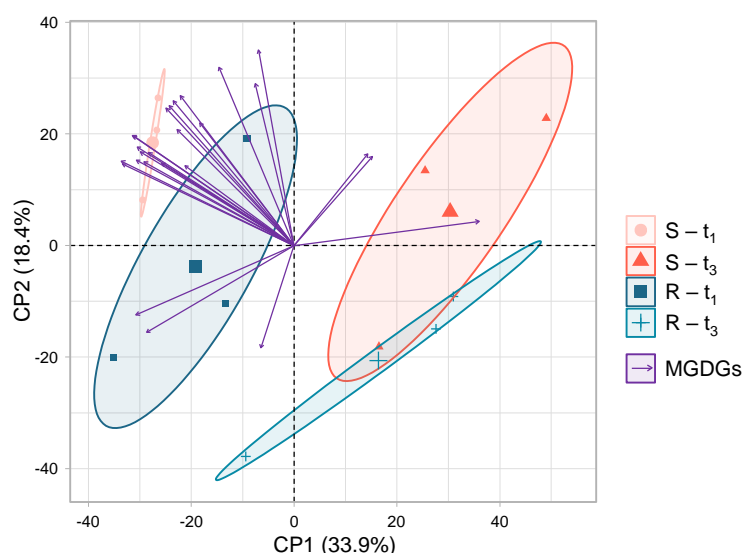


Figure 50. Analyse en composante principale du métabolome total des souches sensibles (S) et résistantes (R) d'*O. mediterraneus* à t_1 et t_3 . Ellipses de confiance à 95% autour du point moyen de chaque condition. Les coordonnées des flèches correspondent à la contribution des différents monogalactosyl diacylglycérols (MGDGs) de type 18:X/16:X à chaque composante.

La comparaison de l'expression de la MGDS et de l'abondance de MGDG 18:1/16:0 entre t_1 et t_3 suggère une congruence entre l'expression du gène et l'abondance du métabolite synthétisé sous l'activité de ce gène dans chacune des souches (**Figure 51**). Pour le MGDG 18:0/16:0 cette congruence n'est observée que chez le phénotype sensible, bien qu'une diminution de l'abondance du métabolite soit observée chez le phénotype résistant. Enfin, si l'on considère l'ensemble des différents galactolipides de type 18:X/16:X synthétisés par *O. mediterraneus* alors la somme de leur abondance dans la cellule est corrélée à l'expression

du gène précurseur de la voie (**Figure 51C, Figure S31**). Ainsi, nous mettons en évidence le principe de **congruence** lorsque **la variation de l'abondance d'un métabolite est corrélée à la variation de l'expression du gène responsable de sa synthèse**. Ce principe servira d'hypothèse pour l'interprétation des résultats de l'analyse différentielle des données métabolomique et transcriptomiques entre souches.

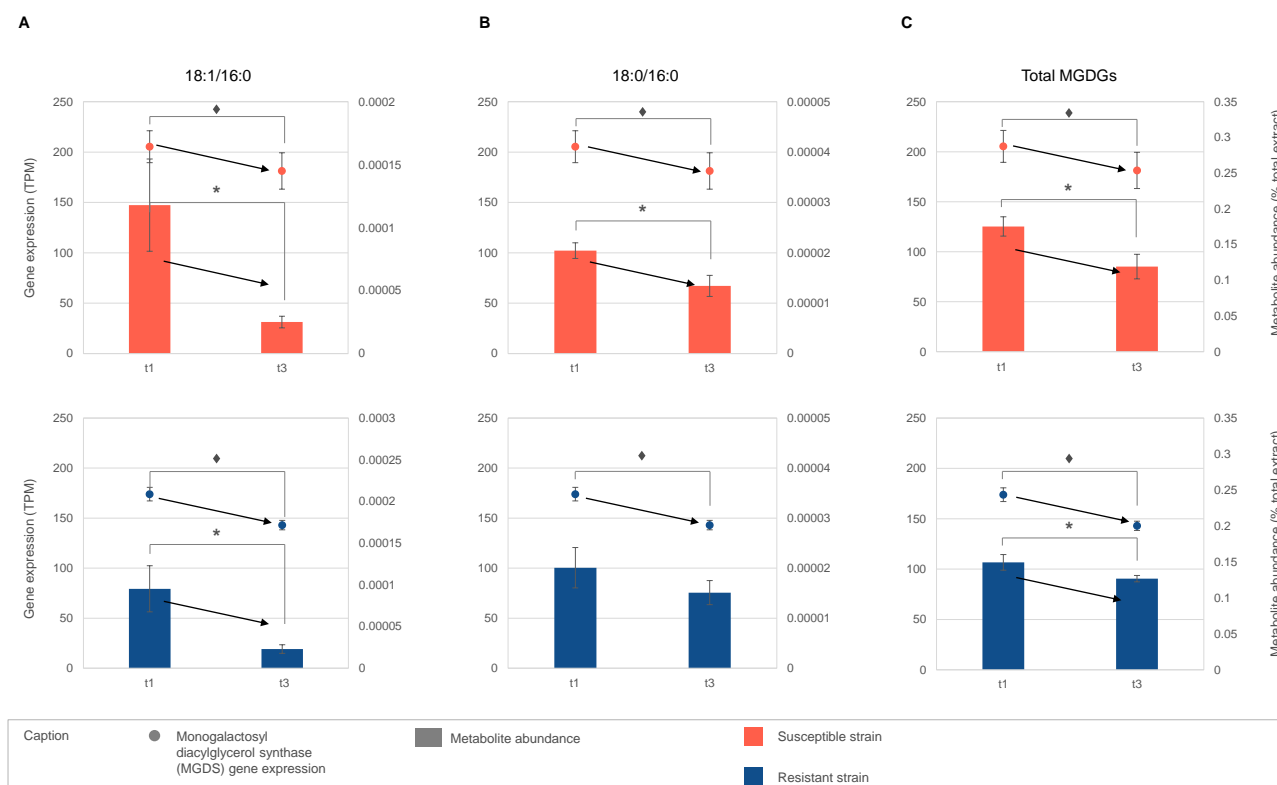


Figure 51. Graphiques superposés de l'expression de la monogalactosyl diacylglycérol synthase (MGDS) (nuage de points) et de l'abondance des galactolipides (histogrammes) **A.** MGDG 18:1/16:0, **B.** MGDG 18:0/16:0 et **C.** des galactolipides totaux à t₁ et t₃. Le losange et l'astérisque symbolisent respectivement une expression différentielle et une abondance significativement différente entre les temps t₁ et t₃ pour chaque souche (test de comparaison de moyennes de Student, valeur-*p* < 0.05).

5.2. DU METABOLITE A L'EXPRESSION DES GENES : LE CAS DES GALACTOLIPIDES

5.2.1. BIOSYNTHESE DES GALACTOLIPIDES

Les biomarqueurs les plus diversifiés sont les MGDGs oxydés. La synthèse de cette classe de métabolites résulte de l'assemblage de chaînes acyles fortement insaturées et du galactose sur le squelette glycérol. L'oxydation des chaînes acyles intervient vraisemblablement après la synthèse du galactolipide.

La synthèse débute par l'élongation des chaînes acyles dans la mitochondrie. Tous les gènes codant pour les enzymes de la voie d'élongation sont significativement surexprimés dans la souche sensible à t_1 (**Figure 52**), tandis que le transporteur FAX (Fatty Acid Transporter) d'acides gras libres vers l'espace intermembranaire mitochondrial est sous-exprimé. L'enzyme d'entrée de la voie de biosynthèse des acides gras, l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase), est considérée comme limitante (Reverdatto et al., 1999) mais la surexpression du gène correspondant *ACCI* montre des effets différents selon l'espèce considérée : la production d'acides gras n'est pas accrue chez les diatomées *Cyclotella cryptica* et *Navicula saprophila* alors que l'effet inverse est observé chez *C. reinhardtii* (Chen et al., 2019; Dunahay et al., 1996; Radakovits et al., 2012). Le processus de régulation de la biosynthèse des acides gras ne repose selon l'espèce pas uniquement sur l'activation transcriptionnelle de la première étape de la voie. Le malonyl-ACP (Acyl Carrier Protein) est le substrat fournissant deux unités de carbones au complexe multienzymatique FAS (Fatty Acid Synthase) assurant de manière itérative l'élongation des chaînes acyles jusqu'à 18 carbones. Le complexe FAS regroupe quatre enzymes parmi lesquelles la 3-ketoacyl-ACP synthase (KAS) assure l'incorporation du malonyl-CoA. Dans l'ordre du processus itératif, KAS III réalise la condensation de malonyl-ACP avec un acétyl-ACP, KAS I l'incorporation successive de malonyl-ACP sur les chaînes C4 à C16 et enfin KAS II assure la synthèse de 18:0-ACP à partir de 16:0-ACP. La 3-kétoacyl-ACP réductase (KAR), la 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase (HD) et enfin l'énoyl-ACP réductase (ENR) réalisent respectivement la réduction, la déshydratation et une nouvelle réduction de la chaîne acyle-ACP (Li-Beisson et al., 2010). La stéaroyl-ACP désaturase (SAD) soluble assure la synthèse de 18:1-ACP à partir du 18:0-ACP (Lindqvist et al., 1996). Les chaînes acyles-ACP néoformées sont soit exportées vers d'autres compartiments cellulaires (cytoplasme, RE) soit mobilisées pour la synthèse des lipides plastidiaux dont les MGDGs. Préalablement à l'export du plaste, les chaînes acyles sont hydrolysées par une thioestérase (FAT) générant ainsi des acides gras libres. Ces derniers traversent l'enveloppe interne du chloroplaste au travers d'un transporteur actif FAX (Fatty Acid Export). Les étapes conduisant à l'export vers le cytoplasme ne sont en revanche pas connues. La sous-expression du transporteur FAX dans la souche sensible au regard de la surexpression des gènes codant pour la synthèse des chaînes acyles suggère une redirection de la production d'acide gras pour la synthèse de lipides plastidiaux comme les MGDGs. Les galactolipides biomarqueurs sont, selon toute vraisemblance, synthétisés dans le chloroplaste et des constituants de cet organite comme le suggère le patron de longueur de chaînes acyles aux positions *sn*-1 et *sn*-2 : 18:X/16:X (X = insaturations). L'incorporation des chaînes acyles *sn*-1 et *sn*-2 sur le précurseur glycérol-3-

phosphate est assurée respectivement par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) et l'acide lysophosphatidique acyltransférase (LPAAT). La déphosphorylation de l'acide phosphatidique est assurée par une acide phosphatidique phosphatase (PAP) puis l'incorporation de l'unité galactose par la MGDG-synthase (MGDS). Une GPAT chloroplastique a été annotée chez *O. mediterraneus* (Ostme06g03770) mais une phospholipide/glycérol acyltransférase (Ostme17g01300) pouvant correspondre à la même enzyme dans le RE est également retrouvée. Il est intéressant d'observer que la GPAT chloroplastique est significativement surexprimée par le phénotype sensible tandis que la GPAT microsomale putative montre la tendance inverse (**Tableau 6**). L'analyse de plusieurs génomes de microalgues vertes révèle la présence d'une unique LPAAT chloroplastique sans homologue microsomale (Misra et al., 2014). La LPAAT d'*O. mediterraneus* (Ostme06g03510) est également significativement surexprimée par le phénotype sensible. Deux PAPs ont été annotées chez *O. mediterraneus*, l'une d'entre elle (Ostme09g02170) est systématiquement fortement surexprimée par le phénotype sensible quel que soit l'horaire d'échantillonnage. Enfin, la MGDG synthase (MGDS), l'enzyme assurant la synthèse des MGDGs précurseurs 18:0/16:0 et 18:1/16:0, est également sur-exprimée dans le phénotype sensible alors que la DGDS (DGDG synthase) est sous-exprimée par rapport au phénotype résistant. **Le flux métabolique est dirigé vers la synthèse des MGDGs chez la souche sensible** puisque l'ensemble des gènes de la voie de biosynthèse est surexprimé alors que les gènes participant à l'export et à la synthèse de DGDGs sont sous-exprimés dans cette même souche relativement au phénotype résistant.

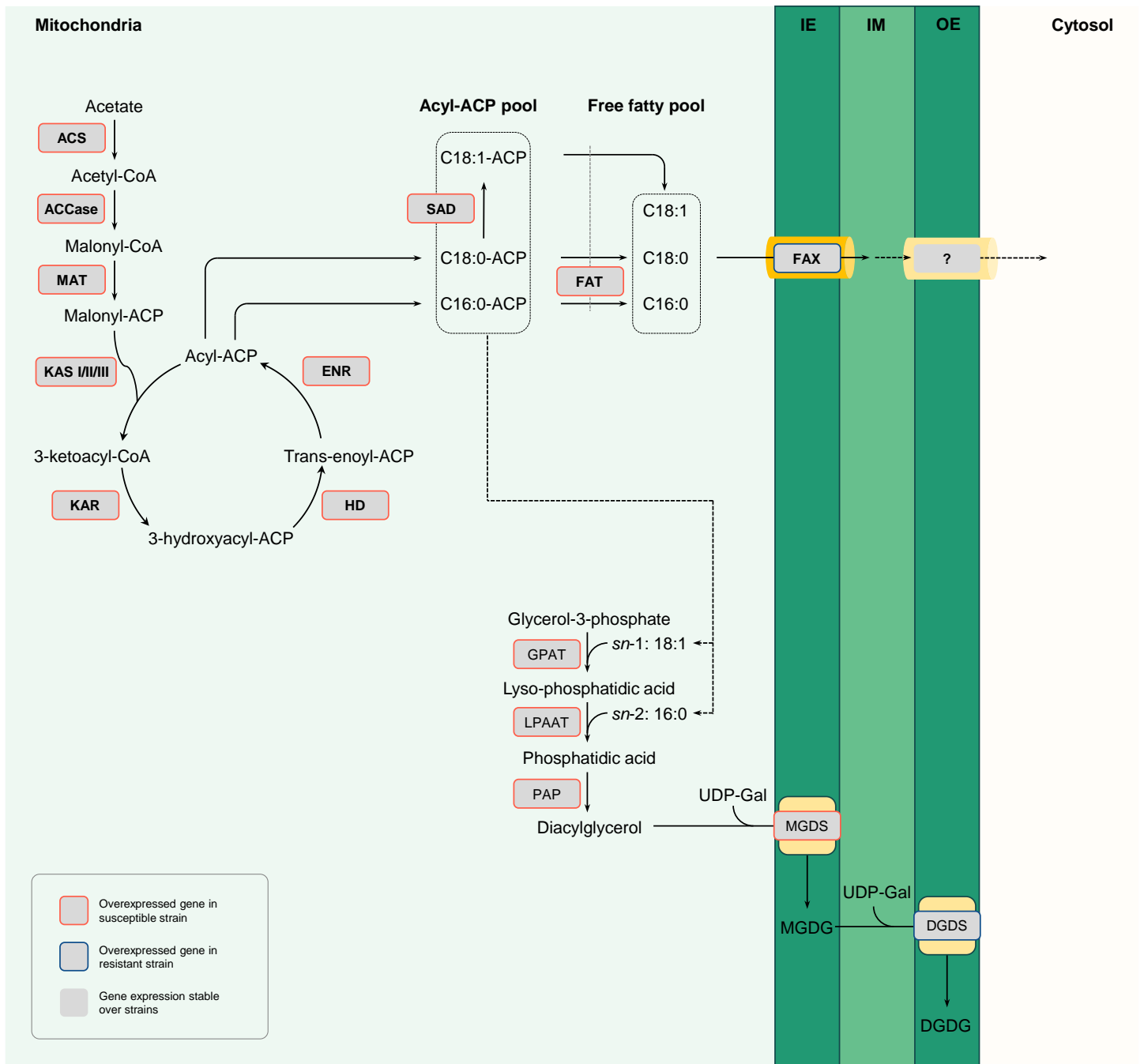


Figure 52. Voie d'élongation des chaînes acyles dans la mitochondrie et de synthèse de galactolipides. Pour chaque enzyme le cadre de couleur indique dans quelle souche est significativement surexprimé le gène à t_1 : résistante (bleu) ou sensible (rouge). ACCase: acétyl-CoA carboxylase ; ACP : protéine transporteur de chaînes acyles ; ACS : acétyl-CoA synthase ; DGDS : digalactosyl diacylglycérol synthase ; ENR: énoyl-ACP réductase ; FAT: acide gras-ACP thioestérase ; FAX : acide-gras export ; GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase ; HD: 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase ; IE : membrane interne ; IM : espace intermembranaire ; EO : membrane externe ; KAR: 3-kétoacyl-ACP réductase ; KAS: 3-kétoacyl-ACP synthase ; LACS: longue chaîne acyl-CoA synthétase ; LPAAT : acide

lysophosphatidique acyltransférase ; MAT : malonyl-CoA:ACP transacylase ; MGDS : monogalactosyl diacylglycérol synthase ; PAP : acide phosphatidique phosphatase ; SAD : stéaroyl-CoA désaturase.

Tableau 5. Liste des galactolipides biomarqueurs, tous sont plus abondants dans la souche sensible.

t_1				t_3			
Comp.	LFC	Strain Annotation	Raw formula	Comp.	LFC	Strain Annotation	Raw formula
4	1.55	MGDG 13:3-O/16:4	C ₃₈ H ₅₈ O ₁₁	8	1.09	MGDG 18:5/16:4-2O	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₂
7	2.03	MGDG 18:4-2O/16:4	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂	37	1.15	MGDG 16:4/18:5-2O isomère 1	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂
8	1.03	MGDG 18:5/16:4-2O	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₂	38	1.31	MGDG 34:7-3O	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₃
9	1.87	MGDG 16:3-2O/18:5	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂	39	1.2	MGDG 16:4/18:5-2O isomère 2	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₂
11	1.18	MGDG 34:7-2O	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₂	40	1.41	MGDG 18:5-O/16:4	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₁
14	1.14	MGDG 34:7-2O	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₂	41	1.47	MGDG 18:4-O/16:4	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₁
16	1.57	MGDG 34:6-2O	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₂	42	1.01	MGDG 18:4-2O/16:4	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂
17	1.14	MGDG 16:4/16:3	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₀	43	1.33	MGDG 16:4/18:5-2O	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂
				44	1.71	MGDG 18:4-O/16:4	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₁
				46	1.3	MGDG 18:3-O/16:4	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₁
				47	1.38	MGDG 34:8-2O	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂
				48	1.18	MGDG 18:3/16:4-O	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₁
				49	1.03	DGDG 32:6	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₅
				52	1.28	MGDG 32:6	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₀
				53	1.07	MGDG 18:5/16:4	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₀

Tableau 6. Liste des gènes de la voie de biosynthèse des galactolipides chez *O. mediterraneus*.

Log₂(fold-change) ; p_{value} avec correction de Bonferoni. ns : non significatif ; ** : $p_{value} < 0.001$; *** : $p_{value} < 0.0001$. LFC > 0 : gènes surexprimés par le phénotype sensible (rouge) ; LFC < 0 : gènes surexprimés par le phénotype résistant (bleu).

Gene Name	Enzyme Name	Enzyme ID	t_1		t_2		t_3		t_4	
			LFC	p_{value}	LFC	p_{value}	LFC	p_{value}	LFC	p_{value}
Ostme04g00660	ACS	Acetyl-CoA synthase	0.458	***	0.172	ns	0.516	ns	0.228	ns
Ostme01g03330	ACCase	Acetyl-CoA synthase	0.539	***	-0.228	ns	-0.558	ns	-0.595	ns
Ostme10g02790	MAT	Malonyl-CoA:ACP transacylase	0.518	***	2.143	***	1.407	ns	-0.196	ns
Ostme04g01420	KAS II	3-Ketoacyl-ACP synthase	0.306	***	0.348	ns	0.560	ns	0.003	ns
Ostme14g01200	KAS III	3-Ketoacyl-ACP synthase	0.482	***	1.245	ns	-0.200	ns	-0.252	ns
Ostme01g04700	KAR	3-Ketoacyl-ACP reductase	0.454	***	0.519	ns	0.208	ns	-0.106	ns
Ostme09g04604	HD	3-Hydroxyacyl-ACP deshydratase	0.951	***	-0.230	ns	0.059	ns	0.057	ns
Ostme06g03940	ENR	Enoyl-ACP reductase	0.530	***	-0.901	ns	-0.571	ns	-0.151	ns
Ostme02g03570	SAD	Stearoyl-CoA desaturase	0.240	**	0.272	ns	0.549	ns	0.280	ns
Ostme01g00070	FAT	Fatty acid-ACP thioesterase	0.247	*	0.203	ns	-0.190	ns	-0.291	ns
Ostme05g04610	FAX	Fatty acid export	-0.535	***	0.154	ns	0.336	ns	0.239	ns
Ostme06g03770	GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	0.214	*	-0.156	ns	-0.041	ns	-0.227	ns
Ostme17g01300	GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	-0.113	ns	-0.140	ns	-0.456	ns	-0.226	ns
Ostme06g03510	LPAAT	Lysophosphatidique acyltransferase	0.558	***	0.328	ns	0.237	ns	-0.005	ns
Ostme09g02170	PAP	Phosphatidic acid phosphatase	1.033	***	1.746	***	1.700	***	1.779	***
Ostme12g02730	PAP	Phosphatidic acid phosphatase	0.424	*	-0.596	ns	0.284	ns	0.161	ns
Ostme04g02290	MGDS	Monogalactosyl diacylglycerol synthase	0.507	***	0.118	ns	0.525	ns	0.230	ns
Ostme06g03310	DGDS	Digalactosyl diacylglycerol synthase	0.036	ns	-0.021	ns	-0.042	ns	-0.187	ns
Ostme11g01490	DGDS	Digalactosyl diacylglycerol synthase	-0.388	**	-0.243	ns	-0.197	ns	-0.266	ns

5.2.2. BIOSYNTHESE DES GALACTOLIPIDES INSATURES

Les galactolipides néoformés de type 18:0/16:0 et 18:1/16:0 sont minoritaires chez *Ostreococcus*. Les MGDGs fortement insaturés sont beaucoup plus abondants et sont produits au travers d'étapes de désaturations successives des deux chaînes acyles. Les enzymes impliquées sont des acides gras désaturases ou FAD (Fatty Acid Desaturase). Cinq ont pu être caractérisées dans le genre *Ostreococcus* : une acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase localisée dans le réticulum endoplasmique (RE) d'*O. tauri* (Domergue et al., 2005), une $\Delta 4$ du RE d'*O. lucimarinus* (Ahmann et al., 2011), une $\Delta 5$ du RE d'*O. lucimarinus* et d'*O. tauri* (Tavares et al., 2011) et enfin récemment deux désaturases plastidiales de type $\Delta 6-\omega 6$ et $\Delta 6-\omega 3$ (Degraeve-Guilbault et al., 2020). Ces deux dernières désaturases catalysent préférentiellement respectivement les réactions suivantes $18:2^{\Delta 9,12}-\omega 6 \rightarrow 18:3^{\Delta 6,9,12}-\omega 6$ et $18:3^{\Delta 9,12,15}-\omega 3 \rightarrow 18:4^{\Delta 6,9,12,15}-\omega 3$. L'ensemble de ces désaturases sont retrouvées dans le génome d'*O. mediterraneus*.

Ainsi, 19 désaturases putatives ont été identifiées chez *O. mediterraneus* sur la base de recherche de séquences orthologues et de domaines protéiques caractéristiques des acides gras désaturases (domaines IPR) (**Tableau 7**). Par homologie de séquence avec *A. thaliana* ou *C. reinhardtii* les gènes codant pour les enzymes suivantes ont pu être identifiées : la stéaroyl-ACP désaturase (SAD) soluble catalysant la désaturation en $\Delta 9$ du stéaroyl-ACP ($18:0\text{-ACP} \rightarrow 18:1^{\Delta 9}\text{-ACP}$), la FAD5 catalysant la désaturation en $\Delta 7$ du palmitoyl-MGDG ($16:0\text{-MGDG} \rightarrow 16:0^{\Delta 7}\text{-MGDG}$) en *sn-2*, la D4FAD désaturase assurant la formation de $16:4\text{-MGDG}$ ($16:3^{\Delta 7,10,13}\text{-MGDG} \rightarrow 16:4^{\Delta 4,7,10,13}\text{-MGDG}$) et enfin la FAD4 microsomale assurant la désaturation en $\Delta 3$ du palmitoyl-PG ($16:0\text{-PG} \rightarrow 16:0^{\Delta 3}\text{-PG}$) en *sn-2*. Toutefois, les voies de désaturation des chaînes acyles des galactolipides sont incomplètes chez *Ostreococcus*, seuls les 4 gènes codants pour les désaturases chloroplastiques sont connus.

Tableau 7. Liste des désaturases putatives chez *O. mediterraneus*. LFC : Log₂(fold-change) ; p_{value} avec correction de Bonferoni. ns : non significatif ; ** : $p_{value} < 0.001$; *** : $p_{value} < 0.0001$. LFC > 0 : gènes surexprimés par le phénotype sensible (rouge) ; LFC < 0 : gènes surexprimés par le phénotype résistant (bleu).

Gene Name	Desaturase Name	Putative function	IPR Domain	Localization	t1		t2		t3		t4	
					LFC	p_{value}	LFC	p_{value}	LFC	p_{value}	LFC	p_{value}
Ostme01g06150	NA	Δ4	FAD-1 Cyt b5	ER	0.524	***	-0.417	ns	-0.360	ns	-0.154	ns
Ostme01g06150	NA	Unknown	FAD-1 Cyt b5	Unknown	0.524	***	-0.417	ns	-0.360	ns	-0.154	ns
Ostme02g03560	NA	Δ6/Δ8	FAD-1 Cyt b5	Unknown	-0.390	***	0.137	ns	0.377	ns	-0.011	ns
Ostme02g03570	SAD	Δ9	FAD-2	Chloroplast	0.240	**	0.272	ns	0.549	ns	0.280	ns
Ostme02g03930	NA	Unknown	FAD-1 Cyt b5	Unknown	-0.715	***	-0.427	ns	-0.302	ns	-0.588	ns
Ostme02g03940	NA	Unknown	FAD-2	Unknown	0.836	***	0.293	ns	0.766	ns	0.597	ns
Ostme03g00170	NA	Δ6 ω-3	FAD-1 Cyt b5	Chloroplast	0.477	***	0.198	ns	-0.621	ns	0.148	ns
Ostme04g04000	NA	Δ12	FAD-1	Unknown	0.308	***	0.087	ns	0.080	ns	0.065	ns
Ostme07g01820	NA	Unknown	FAD-1/carotene isomerase	Unknown	-0.545	***	0.218	ns	1.915	***	-0.401	ns
Ostme07g02650	NA	Δ5	FAD-1 Cyt b5	ER	0.424	***	0.724	ns	0.731	ns	0.356	ns
Ostme08g02540	D4FAD	Δ4	FAD-1 Cyt b5	Chloroplast	0.253	ns	0.385	ns	0.568	ns	-0.089	ns
Ostme08g03410	Acyl-CoA Des.	Δ6	FAD-1 Cyt b5	ER	0.273	ns	0.158	ns	0.287	ns	-0.161	ns
Ostme09g03100	NA	Unknown	FAD-1	Unknown	0.532	***	0.378	ns	0.259	ns	0.502	ns
Ostme10g02950	FAD4	Δ3	similar to ubiquitin ligase	ER	0.340	***	1.230	ns	0.635	ns	0.569	ns
Ostme12g01160	NA	Unknown	FAD-1 Cyt b5	Unknown	0.119	ns	0.060	ns	0.414	ns	-0.307	ns
Ostme12g01160	NA	Δ6 ω-6	FAD-1 Cyt b5	Chloroplast	0.119	ns	0.060	ns	0.414	ns	-0.307	ns
Ostme17g02210	NA	Δ12	FAD-1 Cyt b5	Unknown	0.542	***	0.519	ns	0.250	ns	0.174	ns
Ostme17g02320	FAD5	Δ7	FAD-1 Cyt b5	Chloroplast	0.517	***	0.315	ns	0.483	ns	0.206	ns
Ostme18g00100	NA	Unknown	FAD-1 Cyt b5	Unknown	-0.235	ns	0.044	ns	-0.026	ns	0.259	ns

Le rôle de FAD5 est visiblement crucial dans l'orientation du substrat MGDG 18:1/16:0 vers la synthèse de MGDGs ou de DGDGs. En effet, chez *Ostreococcus* ou encore *Arabidopsis*, la chaîne acyle à 16 atomes de carbone en *sn*-2 des MGDGs comporte souvent 3 à 4 insaturations (16:3, 16:4) tandis que celle des DGDGs est majoritairement saturée (16:0). Le DGDG dérivant du MGDG, il a été proposé que les MGDGs insaturés ne servent pas à la synthèse de DGDGs (Boudière et al., 2014; Petroustos et al., 2014). L'orientation du substrat vers la synthèse de MGDGs polyinsaturés ou de DGDGs serait conditionnée par l'activité de la FAD5. Ici, le gène associé est surexprimé par le phénotype sensible, suggérant une hausse de la production de MGDGs insaturés ce qui coïncide avec la surreprésentation de MGDGs dans les cellules sensibles.

La surexpression de la désaturase Δ6-ω3 par la souche sensible implique une production accrue de 18:4-MGDGs. Par ailleurs, la surexpression de ce gène chez *O. tauri* conduit à un doublement de la quantité de MGDG 18:5/16:4 dans la cellule par rapport au phénotype témoin ou même à celui surexprimant la désaturase Δ6-ω6 (Degraeve-Guilbault et al., 2020). La production de galactolipides avec des chaînes acyles fortement insaturées en *sn*-1 serait favorisée par l'activité de la désaturase Δ6-ω3. Cette observation est partagée dans le travail présent puisque la désaturase Δ6-ω3 est surexprimée dans la souche sensible (quant à

l'expression de la désaturase $\Delta 6-\omega 6$ elle est identique entre souche) et les galactolipides fortement insaturés, qu'ils soient oxydés ou non sont également plus abondants dans cette même souche (**Tableau 5, Figure S31**).

La D4FAD catalysant l'oxydation d'un acide gras C16:3 lié à la position *sn*-2 d'un MGDG en C16:4 n'est pas significativement différentiellement exprimée entre les deux souches bien que son expression soit plus forte dans la souche sensible. Par ailleurs, le rôle et la localisation des autres désaturases n'est pas connu, mais 11 d'entre elles sont surexprimées par le phénotype sensible et seulement 4 par la résistante. **L'activité de désaturation des lipides**, qu'ils soient chloroplastiques ou extra-chloroplastiques, **est accrue chez le phénotype sensible**. La désaturase putative (Ostme02g03560) peut correspondre à une $\Delta 6$ -lipide ou une $\Delta 8$ -sphingolipide désaturase puisque ces deux types d'enzymes partagent des séquences hautement similaires (Song et al., 2014). Chez le cassis (*Ribes nigrum*), la $\Delta 6$ -lipide désaturase utilise la phosphatidylcholine comme substrat préférentiel mais cette classe de composés est absente chez *Ostreococcus* (Degraeve-Guilbault et al., 2017). Il est probable qu'Ostme02g03560 code pour une $\Delta 8$ -sphingolipide désaturase et la surexpression de ce gène dans la souche résistante pourrait corrélérer avec la production accrue du céramide d18:1/16:0 dont la chaîne de base comporte une insaturation (voir **paragraphe 5.4**).

De manière globale, l'activité désaturase et l'accumulation de galactolipides fortement désaturés sont significativement accrues chez la souche sensible. Ces observations seront discutées par rapport à l'accumulation des formes oxydées de galactolipides dans ce même phénotype sensible dans le paragraphe suivant. En effet, les MGDGs jouent essentiellement un rôle structurel au sein des membranes chloroplastiques mais les données bibliographiques suggèrent que ces composés peuvent servir de substrat à diverses oxydases. Les formes oxydées de galactolipides auraient alors des fonctions complètement différentes au sein de la cellule.

5.2.3. OXYDATION DES GALACTOLIPIDES

L'oxydation des chaînes acyles des galactolipides reste un mécanisme peu décrit. La lipoxigénase LOX1 (codée par *LOX1* chez *A. thaliana* ou *Glycine max*) serait la candidate la plus probable pour une oxydation direct des chaînes acyles des MGDGs comme le suggère une expérience menée *in vitro* (Nakashima et al., 2011). Le gène Ostme02g00890 codant pour une LOX putative a pu être identifiée chez *O. mediterraneus*. En effet, c'est le seul gène à partager le domaine protéique PLAT/LH2 (PLAT : Polycystin-1, Lipoxygénase, Alpha-Toxin ; LH2

Lipoxygenase Homology) caractéristique des LOXs. Toutefois, l'expression de ce gène ne varie pas significativement entre la souche sensible et la souche résistante (**Tableau 8**).

Tableau 8. Liste des gènes impliqués dans l'oxydation des chaînes acyles chez *O. mediterraneus*. LFC : $\text{Log}_2(\text{fold-change})$; p_{value} avec correction de Bonferoni. ns : non significatif ; * : $p_{\text{value}} < 0.01$; ** : $p_{\text{value}} < 0.001$; *** : $p_{\text{value}} < 0.0001$. LFC > 0 : gènes surexprimés par le phénotype sensible (rouge) ; LFC < 0 : gènes surexprimés par le phénotype résistant (bleu). CYP47 : Cytochrome P450, famille 74 ; α -DOX : α -dioxygénase ; LOX : lipoxygénase ; PLAI : phospholipase ; PLIP1 : lipase plastidiale.

Gene Name	Enzyme Name	IPR Domain	IPR ID	t ₁		t ₂		t ₃		t ₄	
				LFC	p _{value}	LFC	p _{value}	LFC	p _{value}	LFC	p _{value}
Ostme01g06150	LOX	PLAT/LH2	IPR001024	-0.146	ns	0.050	ns	0.004	ns	-0.330	ns
Ostme11g03410	PLIP1	Lipase-like domain	IPR002921	-0.180	ns	-0.425	ns	-0.498	ns	-0.527	ns
Ostme01g01200				0.703	***	0.765	ns	0.614	ns	0.058	ns
Ostme06g01790				0.303	**	0.091	ns	0.103	ns	0.186	ns
Ostme08g02030				0.192	ns	2.438	**	1.866	ns	-0.787	ns
Ostme09g03750	CYP74	CYP450, CYP450 E-family	IPR001128, IPR036396	-0.114	ns	-0.309	ns	-0.551	ns	-0.223	ns
Ostme10g02310				0.579	***	-0.890	ns	1.745	ns	-0.444	ns
Ostme11g01460				0.135	ns	0.361	ns	0.076	ns	-0.380	ns
Ostme14g02350				-0.251	*	0.226	ns	0.288	ns	-0.791	ns
Ostme16g00170				0.173	ns	0.124	ns	-0.236	ns	-0.253	ns
Ostme01g03000				-0.380	***	-0.024	ns	0.113	ns	-0.312	ns
Ostme08g00190	α -DOX	Heam peroxidase	IPR037120	0.341	***	0.221	ns	0.336	ns	0.029	ns
Ostme10g00520				-3.101	***	0.800	ns	1.286	ns	0.867	ns
Ostme10g01260				0.992	ns	0.008	ns	0.350	ns	0.483	ns
Ostme05g01300	PLAI	Phospholipase A2	IPR002641	-0.290	**	-0.187	ns	0.091	ns	-0.113	ns

Les voies alternatives d'oxydation proposées impliquent une hydrolyse des chaînes acyles, leur oxydation puis ré-estérification sur le glycérol. Dans cette perspective deux lipases plastidiales (PLIP2 et PLIP3) ont été identifiées chez *A. thaliana*. Seul un gène *PLIP* homologue a été identifié chez *O. mediterraneus* et mais aucun gène orthologue à l'Allène Oxyde Synthase (AOS) et l'Allène Oxyde Cyclase (AOC) de la voie de synthèse des oxylipines n'ont pu être identifiés. AOC et AOS font partie de la famille d'oxygénases CYP74 dérivant des cytochromes P450. La recherche des domaines protéiques IPR 001128 et IPR 036396 caractéristiques des CYP74 a conduit à identifier huit oxygénases putatives, dont trois d'entre elles sont significativement surexprimées dans le phénotype sensible (**Tableau 8**). Sur les 4 α -dioxygénases (α -DOX) une et deux sont surexprimées respectivement dans la souche sensible et résistante.

L'activité oxydase est probablement accrue chez le phénotype sensible expliquant l'accumulation de formes oxydées de galactolipides. Par ailleurs, la souche résistante surexprime le gène Ostme05g01300, orthologue de *PLAI* codant pour une phospholipase chez

A. thaliana, qui est impliqué dans l'hydrolyse des chaînes acyles oxydées des arabidopsides (Yang et al., 2007). L'activité de cette enzyme peut expliquer la diminution des galactolipides oxydés dans le phénotype résistant. Chez *A. thaliana*, PLAI est capable de libérer l'acide (dinor) 12-oxo phytodiénoïque ((dn)OPDA) des galactolipides pour la synthèse d'acide jasmonique (JA) et les mutants déficients en PLAI affichent une accumulation de galactolipides oxydés (Davoine et al., 2017) (**Figure 53**).

L'accumulation de galactolipides oxydés dans la souche sensible résulte manifestement d'une activité biosynthétique accrue et d'une activité catabolique réduite. La surexpression du gène *PLAI* chez le phénotype résistant soulève la question du devenir des chaînes acyles oxydées dans la cellule et leur rôle possible. Deux hypothèses sont proposées : soit (i) les chaînes acyles oxydées sont un intermédiaire métabolique qui alimente une autre voie ou sont recyclées, soit (ii) elles possèdent un rôle fonctionnel en tant que tel dans la cellule. La première hypothèse peut être confortée par la surexpression des gènes de la voie de β -oxydation des acides gras par le phénotype résistant, notamment les gènes codant pour le transporteur peroxysomal d'acides gras (ABCD1), l'énoyl-CoA isomérase (ECI), l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HADH) et la β -céto thiolase (KAT) (**Tableau 9**). Toutefois, la voie de dégradation des acides gras oxydés n'est pas connue et implique probablement une ou plusieurs étapes de déshydratation, selon le nombre d'oxydations, préalablement à la β -oxydation. La deuxième hypothèse attribue un rôle aux chaînes acyles oxydées, peut-être similaire à celui du JA ou de son précurseur l'OPDA. Le JA est une hormone largement connue pour son rôle dans l'établissement de la réponse immunitaire face aux agents pathogènes (Ruan et al., 2019). Récemment, il a été démontré que l'OPDA avait des capacités régulatrices similaires au JA, mettant en avant l'importance fonctionnelle de cette molécule qui était alors considérée comme un intermédiaire métabolique. En ce sens, l'OPDA est capable d'activer la transcription de gènes indépendants de la voie du JA-isoleucine (Wasternack and Strnad, 2016), participant à l'induction d'une réponse immunitaire chez *A. thaliana* lors de l'infection par le champignon *Alternaria brassicicola* (Stintzi et al., 2001), ou de l'attaque par le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Schäfer et al., 2011). Au même titre que le JA, l'OPDA peut se lier à l'isoleucine afin d'induire l'expression de certains gènes (Arnold et al., 2016; Floková et al., 2016). Toutefois, contrairement au JA, la voie de signalisation et les récepteurs demeurent inconnus. Très récemment l'importance de l'oxydation des acides gras a été mise en avant dans le phénotype résistant de plants de vigne au champignon pathogène *Plasmopara viticola* responsable du mildiou (Figueiredo et al., 2017). Les phénotypes résistants présentent un profil lipidique très

différent et plus fortement oxydé chez le résistant. L'étude a été complétée en révélant le rôle clé d'une phospholipase A plastidiale lors de l'infection modulant le contenu lipidique de manière différente selon le phénotype et dont l'expression est fortement induite durant l'infection chez le phénotype résistant (Laureano et al., 2018).

Tableau 9. Liste des gènes de la β -oxydation des acides gras chez *O. mediterraneus*. LFC : $\text{Log}_2(\text{fold-change})$; p_{value} avec correction de Bonferoni. ns : non significatif ; *** : $p_{\text{value}} < 0.0001$. LFC > 0 : gènes surexprimés par le phénotype sensible ; LFC < 0 : gènes surexprimés par le phénotype résistant. ACX : acétyl-CoA oxydase + acétyl-CoA déshydrogénase ; KAT : β -céto thiolase ; MFP : multifunctional protein complex : ϵ -noyl-CoA hydratase + hydroxyacyl-CoA déshydrogénase.

Gene Name	Enzyme Name	Enzyme ID	Proteic complex	t ₁		t ₂		t ₃		t ₄	
				LFC	p_{value}	LFC	p_{value}	LFC	p_{value}	LFC	p_{value}
Ostme01g04280	Acetyl-CoA oxydase	ACOX	ACX	-0.009	ns	-0.307	ns	0.129	ns	-0.281	ns
Ostme07g02190				-0.261	ns	0.134	ns	0.054	ns	0.148	ns
Ostme01g06640	Acetyl-CoA deshydrogenase	ACDH		-0.044	ns	0.408	ns	-0.188	ns	-0.121	ns
Ostme10g03320	Enoyl-CoA hydratase	EHHADH	MFP	-0.360	ns	0.380	ns	-0.123	ns	0.302	ns
Ostme07g03180	Hydroxyacyl-CoA deshydrogenase	HADH		-2.000	***	-0.458	ns	-0.292	ns	-0.371	ns
Ostme05g04530	β -keto thiolase	KAT	KAT	-0.925	***	-0.019	ns	0.184	ns	0.289	ns

En conclusion de l'étude des galactolipides et des galactolipides oxydés dans les souches résistantes et sensibles d'*O. mediterraneus*, l'expression des gènes reflète le contenu métabolique au sein de chaque souche au cours du temps. L'analyse différentielle entre souches révèle une congruence des deux niveaux d'expression au premier temps d'analyse (t₁). Cette même congruence n'est pas observée à t₃ où l'expression des gènes ne varie plus entre souches alors que de nombreux métabolites sont retrouvés en quantités différentes entre celles-ci. Ce découplage et l'expression très faible des gènes à t₃ témoignent pour ce point d'analyse d'un décalage temporel. Le contenu métabolique résulte vraisemblablement d'évènements transcriptionnels et de biosynthèse antérieurs. Un nombre supérieur de points d'analyse aurait permis de résoudre avec plus de précision les phases de couplage et de découplage entre le transcriptome et le métabolome. L'expression des gènes chez *Ostreococcus* est fortement influencée par le cycle cellulaire et ce même découplage entre l'expression des gènes et l'abondance de certains métabolites selon la période du cycle a été suggéré par Hirth *et al.* (Hirth et al., 2017; Monnier et al., 2010).

Enfin, le rôle biologique des galactolipides oxydés et des acides gras oxydés demeure encore peu étudié dans le cadre des interactions hôtes-pathogènes mais semble prometteur.

L'accumulation de galactolipides oxydés par la souche sensible peut être un marqueur phénotypique intéressant, témoignant d'une rétention d'acides gras oxydés dans la cellule. Comme pour le JA, ce sont peut-être les variations d'abondance de ces différents acides gras oxydés dans la cellule qui modulent, entre autres facteurs, l'induction de la réponse immunitaire. Dans le cas du modèle hôte-virus *Ostreococcus*-Prasinovirus ces conclusions demeurent spéculatives mais fournissent des pistes de prospections intéressantes au vu des différents exemples probants décrits chez plusieurs espèces végétales.

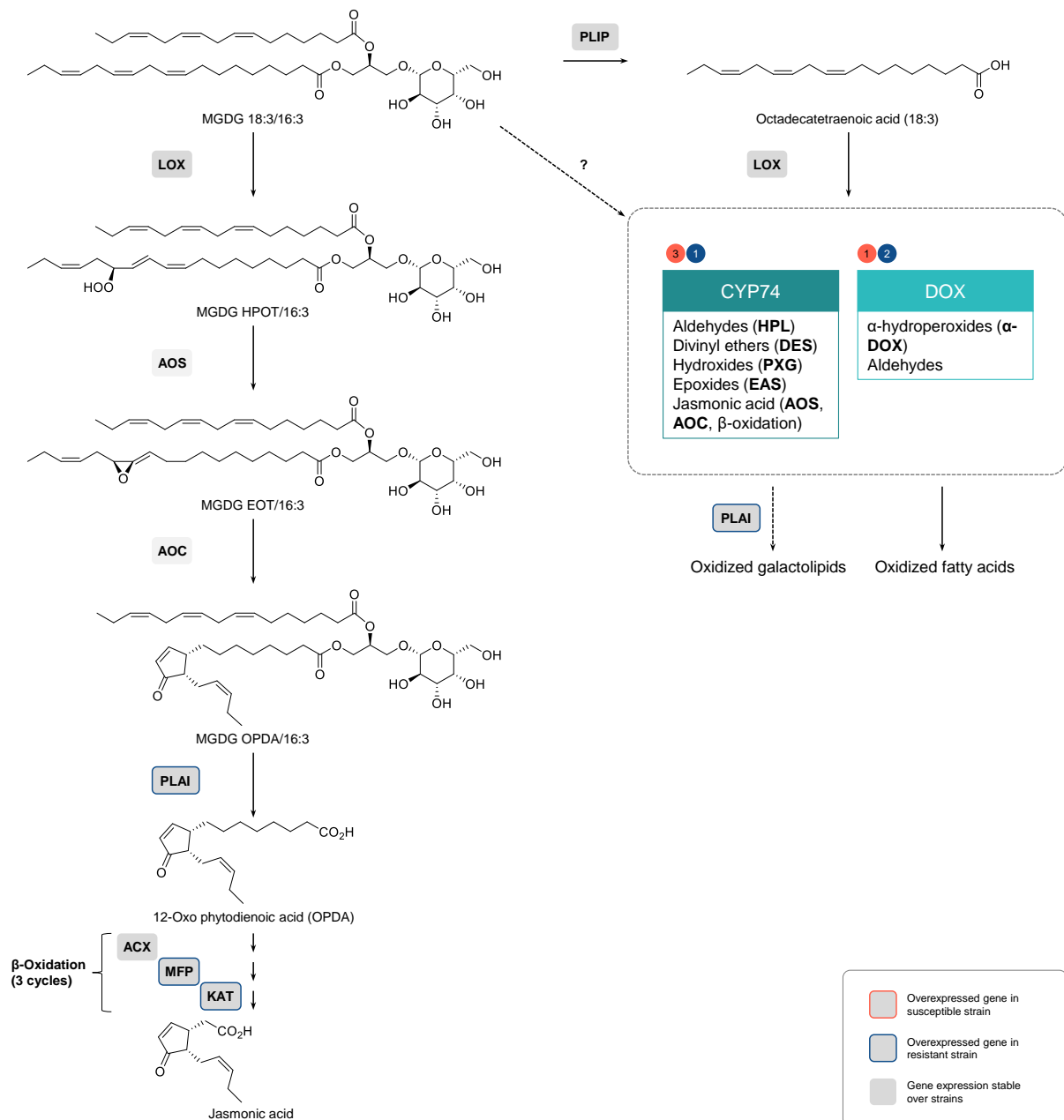


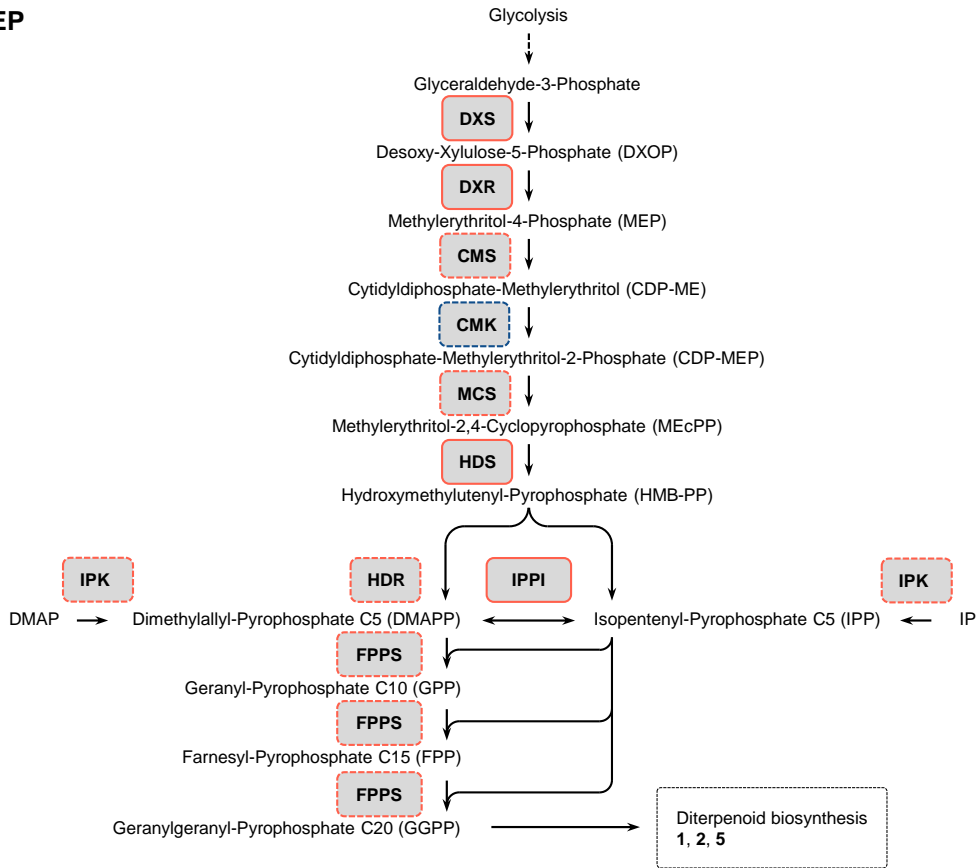
Figure 53. Modèle proposé pour la synthèse de galactolipides et d'acides gras oxydés. Pour chaque enzyme le cadre et les pastilles de couleur indique dans quelle souche est/sont significativement surexprimé(s) le/les gène(s) à t_1 : résistante (bleu) ou sensible (rouge). ACX : acétyl-CoA oxydase + acétyl-CoA déshydrogénase ; AOC : allène oxyde cyclase ; AOS : allène oxyde synthase ; DES : divinyl-éther synthétase ; DOX : α -dioxygénase ; EAS : époxy alcool synthétase ; HPL : hydroperoxyde lyase ; KAT : β -céto thiolase ; LOX : lipoxygénase ; MFP : multifunctional protein complex : énoyl-CoA hydratase + hydroxyacyl-CoA déshydrogénase ; PLAI : phospholipase ; PLIP : lipase plastidiale.

5.3. DU METABOLITE A L'EXPRESSION DES GENES : LE CAS DES PHYTOSTEROLS

Huit biomarqueurs terpéniques ont été identifiés. Trois d'entre eux dérivent de précurseurs diterpéniques tandis que les autres sont des composés triterpéniques de type stérols (**Figure 55**). Chez les Prasinophytes, les unités précurseurs des composés terpéniques, le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) et l'isopentényl-pyrophosphate (IPP), sont synthétisées *via* la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) (Lombard and Moreira, 2011) (**Figure 54**). À t_1 trois gènes sont significativement surexprimés dans la souche sensible. L'un code pour l'enzyme initiatrice de la voie, la désoxy-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) et l'un des deux autres pour l'hydroxyméthylutényl-pyrophosphate synthase (HDS) catalysant la synthèse du précurseur de DMAPP et d'IPP. Cette activité transcriptionnelle accrue se traduit très probablement par une augmentation de la synthèse d'unité isoprénique (DMAPP, IPP) qui sert de précurseur à plusieurs voies métaboliques. A ce titre, la squalène synthase (SQS), l'enzyme initiatrice de la voie de biosynthèse des stérols est également surexprimée dans la souche sensible. De fait, l'activité transcriptionnelle de tous les gènes identifiés au sein de cette voie est accrue dans la souche sensible et significativement supérieure pour les gènes codant pour la cycloeucaalénol cycloisomérase (CPI1), la $\Delta 14$ -stérol réductase (FK), et la $\Delta 7$ -stérol 5-désaturase (STE1) (**Tableau 11, Figure 54**). Le gène de la 24-méthylstérol C-méthyltransférase (SMT2) est également surexprimé ce qui indique une probable orientation de la voie vers la synthèse de 24-éthyl-stérols, des stérols à 29 atomes de carbone comme quatre des biomarqueurs de l'analyse. *A contrario* les stérols comme les brassinostérols issus de la voie 24-méthyl-stérols ont plutôt des structures à 28 atomes de carbone. A ce sujet, les stérols C29 sont plus abondants que les stérols de type C27 et C28 chez les Prasinophytes ce qui en font des marqueurs de ces algues vertes (Kodner et al., 2008). Toutefois, il convient de préciser que les voies de biosynthèse des stérols sont très ramifiées chez les plantes et les algues, où de nombreuses enzymes viennent

modifier la structure de base pouvant masquer l'origine biosynthétique du stérol. Ces ramifications interviennent généralement en aval des voies principales décrites en **Figure 54**, et sont très largement spécifiques à une espèce ou un groupe d'espèces suggérant une spécialisation, potentiellement adaptative, de cette classe de composés (Jaramillo-Madrid et al., 2020).

MEP



Sterols

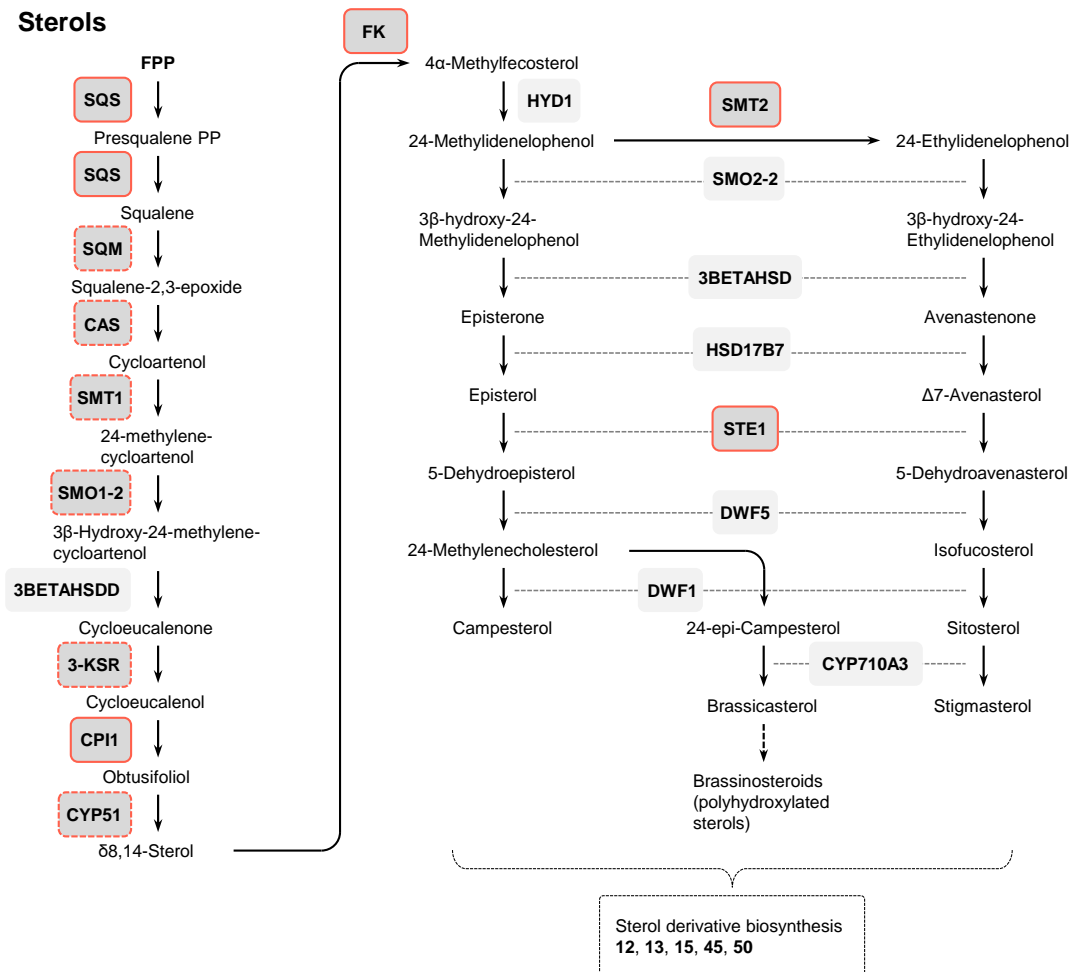


Figure 54. Voies de biosynthèse du méthylérythritol-4-phosphate (MEP) et des stérols végétaux (phytostérols). Pour chaque enzyme le cadre et les pastilles de couleur indique dans quelle souche est significativement surexprimé le gène à t_1 : résistante (bleu) ou sensible (rouge). 3BETAHSD : 3 β -hydroxystéroïde-4 α -carboxylate 3-déhydrogénase ; CAS : cycloarténol synthase ; CMK : CDP-ME kinase ; CMS : MEP cytidyltransferase ; CPI : cycloeucaalénol cycloisomérase ; CYP51 : Stérol 14 α -déméthylase ; CYP710A : stérol 22-désaturase ; DWF1 : Δ 24-stérol réductase ; DWF5 : 7-déhydrocholestérol réductase ; DXR : DXP réductoisomérase ; DXS : DOXP synthase ; FK : Δ 14-stérol réductase ; FPPS : farnésyl pyrophosphate synthase ; HDS : HMB-PP synthase ; HDR : HMB-PP réductase ; HSD17B7 : 3 β -hydroxystéroïde 3-déhydrogénase ; HYD : cholestérol Δ -isomérase ; IPK : IP kinase ; IPPI : IPP isomérase ; 3-KSR : 3 β -hydroxystéroïde 3-déhydrogénase ; MCS : MECCP synthase ; SQM : squalène monooxygénase ; SQS : squalène synthase ; SMO1-2 : 4,4-diméthylstérol C-4 α -méthyl-monooxygénase ; SMO2-2 : 4 α -monométhylstérol monooxygénase ; SMT1 : Stérol 24-C-méthyltransferase ; SMT2 : 24-méthylstérol C-méthyltransferase ; STE : Δ 7-stérol 5-désaturase.

Tableau 10. Liste des composés terpéniques biomarqueurs. Tous sont plus abondants dans la souche sensible à t_1 et t_3 .

t_1					t_3				
Comp.	LFC	Strain	Annotation	Raw formula	Comp.	LFC	Strain	Annotation	Raw formula
1	1.14	■	Putative diterpene	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	13	1.32	■	Putative sterol	C ₃₁ H ₄₄ O ₅
2	1.14	■	Putative diterpene	C ₂₂ H ₂₈ O	45	1.69	■	Putative sterol	C ₂₉ H ₄₄ O ₂
5	1.64	■	Putative diterpene	C ₁₈ H ₂₈ O	50	1.34	■	Putative sterol	C ₂₉ H ₄₆ O ₂
12	1.02	■	Putative sterol isomer B1	C ₂₉ H ₄₄ O ₃					
13	1.14	■	Putative sterol	C ₃₁ H ₄₄ O ₅					
15	1.04	■	Putative sterol isomer B2	C ₂₉ H ₄₄ O ₃					

Les voies de biosynthèses descendantes ne sont pas décrites chez les Prasinophytes, pour palier à cela nous avons identifié dix gènes candidats possiblement impliqués dans la modification et le métabolisme des stérols sur la base de domaines protéiques caractéristiques (**Tableau 11**). Ainsi, trois stérol méthyltransferases ont pu être inférées et deux d'entre elles varient significativement d'un point de vue transcriptionnel. Le gène Ostme06g04730 (Tocophérol *O*-méthyltransferase) est surexprimé dans la souche résistante tandis qu'Ostme06g01310 (Méthyltransferase type 11) possédant une forte similarité de séquence avec *SMT1* est surexprimée dans le phénotype sensible. L'expression différentielle de ces deux stérol méthyltransferases suggère leur implication dans la synthèse des biomarqueurs, notamment celle du composé **13**, un stérol en C31, qui requiert probablement l'action d'une ou plusieurs méthyltransferases pour sa synthèse.

Tableau 11. Liste des gènes de la voie du méthylérythritol-4-phosphate (MEP) et des phytostérols chez *O. mediterraneus*. LFC : Log₂(fold-change) ; *p*_{value} avec correction de Bonferoni. ns : non significatif ; * : *p*_{value} < 0.01 ; ** : *p*_{value} < 0.001 ; *** : *p*_{value} < 0.0001. LFC > 0 : gènes surexprimés par le phénotype sensible ; LFC < 0 : gènes surexprimés par le phénotype résistant. CDP-ME : cytidyldiphosphate-méthylérythritol ; DMAPP : diméthylallyl-pyrophosphate ; DOXP : désoxy-xylulose-5-phosphate ; HMB-PP : hydroxyméthylutényl-pyrophosphate ; IPP : isopentényl-pyrophosphate ; MECCP : méthylérythritol-2,4-cyclopyrophosphate ; MEP : méthylérythritol-4-phosphate.

Gene Name	Enzyme Name	Enzyme ID	t ₁		t ₂		t ₃		t ₄	
			LFC	<i>p</i> _{value}	LFC	<i>p</i> _{value}	LFC	<i>p</i> _{value}	LFC	<i>p</i> _{value}
Ostme04g00410	DOXP synthase	DXS	0.234	*	0.577	ns	0.669	ns	-0.340	ns
Ostme02g03320	DXP reductoisomerase	DXR	0.227	*	1.336	ns	-0.160	ns	-0.417	ns
Ostme06g03660	MEP cytidyltransferase	CMS	0.008	ns	2.813	**	2.022	ns	-0.140	ns
Ostme15g01030	CDP-ME kinase	CMK	-0.024	ns	1.039	ns	2.021	ns	-0.103	ns
Ostme11g00040	MECCP synthase	MCS	0.005	ns	0.586	ns	1.049	ns	-0.051	ns
Ostme10g00910	HMB-PP synthase	HDS	0.384	***	0.362	ns	-0.435	ns	-0.373	ns
Ostme08g01140	HMB-PP reductase	HDR	0.021	ns	0.251	ns	0.093	ns	-0.141	ns
Ostme13g00210	IPP isomerase	IPPI	0.288	*	-0.353	ns	-0.386	ns	-0.229	ns
Ostme03g04500	IP kinase	IPK	0.069	ns	-0.035	ns	-0.066	ns	-0.011	ns
Ostme07g01240	Farnesyl pyrophosphate synthase	FPPS	0.156	ns	0.709	ns	0.880	ns	-0.283	ns
Ostme02g02130	Squalene synthase	SQS	0.390	***	0.317	ns	-0.098	ns	-0.384	ns
Ostme16g01690	Squalene monooxygenase	SQM	0.077	ns	0.109	ns	-0.093	ns	0.095	ns
Ostme09g00940	Cycloartenol synthase	CAS	0.129	ns	-0.044	ns	-0.156	ns	-0.358	ns
Ostme09g03950	Sterol 24-c-methyltransferase	SMT1	0.153	ns	0.062	ns	0.250	ns	-0.497	ns
Ostme03g04480	4,4-Dimethylsterol C-4 α-methyl-monooxygenase	SMO1-2	0.149	ns	0.218	ns	-0.095	ns	-0.597	ns
?	3β-Hydroxysteroid-4α-carboxylate 3-dehydrogenase	3BETAHSDD	-	-	-	-	-	-	-	-
Ostme02g04300	3β-Hydroxysteroid 3-dehydrogenase	3-KSR	-0.025	ns	0.173	ns	-0.252	ns	-0.185	ns
Ostme02g04720	3β-Hydroxysteroid 3-dehydrogenase	3-KSR	1.374	ns	-0.151	ns	0.091	ns	1.433	ns
Ostme02g04740	Cycloeucaleenol cycloisomerase	CPI	0.319	*	0.193	ns	-0.067	ns	-0.055	ns
Ostme11g01460	Sterol 14α-demethylase	CYP51	0.135	ns	0.361	ns	0.076	ns	-0.380	ns
Ostme09g04110	Δ14-Sterol reductase	FK	0.323	***	0.094	ns	-0.120	ns	-0.025	ns
?	Cholesterol Δ-isomerase	HYD	-	-	-	-	-	-	-	-
Ostme16g00960	24-Methylenesterol C-methyltransferase	SMT2	0.311	**	0.190	ns	-0.019	ns	-0.275	ns
?	4α-Monomethylsterol monooxygenase	SMO2-2	-	-	-	-	-	-	-	-
?	3β-Hydroxysteroid 3-dehydrogenase	HSD17B7	-	-	-	-	-	-	-	-
Ostme03g01060	Δ7-Sterol 5-desaturase	STE	0.717	***	0.016	ns	-0.173	ns	0.228	ns
?	7-Dehydrocholesterol reductase	DWF5	-	-	-	-	-	-	-	-
?	Δ24-Sterol reductase	DWF1	-	-	-	-	-	-	-	-
?	Sterol 22-desaturase	CYP710A	-	-	-	-	-	-	-	-

La balance entre 24-méthyl et 24-éthyl stérols est associée à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, liées au développement ou à la structure des membranes. Chez *A. thaliana*, une déplétion en campesterol et brassinostérol (24-méthyl stérols) conduit à une diminution de l'élongation cellulaire (Schaller, 2003) tandis que les 24-éthyl stérols (sitostérol, stigmastérol) sont utilisés pour la rigidification de la membrane lors d'attaques de pathogènes, d'herbivores ou encore lors de stress abiotiques (Griebel and Zeier, 2010; Rogowska and Szakiel, 2020; Senthil-Kumar et al., 2013). SMT2 se trouve également impliqué dans la mise en place de la réponse immunitaire chez *A. thaliana* puisque les lignées mutantes dépourvues du gène *SMT2* affichent une vulnérabilité accrue face aux pathogènes bactériens (Wang et al., 2012). Les variations transcriptionnelles observées se traduisent très probablement par un

métabolisme et une composition en stérols différents entre les souches, ce qui influencerait directement la structure et le comportement de la membrane plasmique. En effet, si les biomarqueurs dérivent probablement de la voie des 24-éthyl stérols, cette voie assure également la synthèse de sitostérol et stigmastérol qui sont associés dans les membranes aux glycosyl-inositol phosphocéramides (GIPCs) pour former les structures membranaires appelées radeaux lipidiques. Ces structures sont des zones très dynamiques des membranes par le nombre élevé d'enzymes transmembranaires et de complexes de signalisation qu'elles rassemblent (Laloi et al., 2007; Simon-Plas et al., 2011). La teneur en stérols va indirectement influencer l'activité enzymatique, la transduction des signaux ou encore les interactions protéines-protéines et protéines-lipides au niveau de ces structures (Schaller, 2003; Valitova et al., 2016). Des changements dans la teneur en stérols dans les radeaux lipidiques se traduit par des dysfonctionnements des protéines localisées dans ces structures, notamment certains récepteurs viraux. Ce point sera discuté dans le **paragraphe 5.4.2.** traitant des céramides, mais nous pouvons envisager le rôle très important que peut jouer une modulation de la teneur en stérols dans les profils immunitaires de l'algue.

Les stérols biomarqueurs comportent deux à cinq oxydations, ce qui implique l'action d'oxydases pour leur synthèse (**Tableau 12**). Trois gènes comportant un domaine stérol méthyl-oxydase ont pu être identifiés, bien que la fonction précise de ces gènes reste à déterminer car la séquence caractéristique est également commune aux stérol désaturases et aux lipides hydroxylases. Toutefois, l'un de ces gènes (Ostme11g00750) est surexprimé dans le phénotype sensible. Les biomarqueurs oxydés appartiennent probablement à la classe des oxystérols. Les données bibliographiques suggèrent que les oxydations portées par le noyau des oxystérols proviennent de mécanismes d'oxydation chimiques au travers de radicaux libres tandis que les oxydations portées par la chaîne latérale résultent d'actions enzymatiques (Brzeska et al., 2016; Vanmierlo et al., 2013). Le rôle de ces composés chez les plantes est très peu étudié, une étude rapporte les effets délétères de l'accumulation d'oxystérols sur la croissance et la synthèse de phytostérols dans des plants transgéniques d'*A. thaliana* (Beste et al., 2011). L'impact de ces composés sur la structure des membranes ou leur fonctionnement n'a pas été étudié chez les plantes. En revanche, chez l'humain, la présence d'oxystérols d'origine animale et végétale induit l'activation et l'accumulation de facteurs pro-inflammatoire. L'expression de ces facteurs est régulée par le facteur nucléaire κ B (NF- κ B), une protéine de transcription elle-même fortement régulée par les oxystérols (Aye et al., 2012). Les effets des oxystérols sont là aussi

globalement délétères sur l'organisme *via* l'effet pro-inflammatoire qu'ils exercent, induisant par là même l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (Poli et al., 2013).

Tableau 12. Liste des gènes d'oxydases de stérols et de protéines de liaison aux oxystérols. La colonne Sp. indique si le gène est spécifique à la famille des Mamiellales (Mam), à *O. mediterraneus* (Om) ou retrouvé plus largement dans la lignée verte (-). LFC : Log₂(fold-change) ; *p*_{value} avec correction de Bonferoni. ns : non significatif ; * : *p*_{value} < 0.01 ; ** : *p*_{value} < 0.001 ; *** : *p*_{value} < 0.0001. LFC > 0 : gènes surexprimés par le phénotype sensible ; LFC < 0 : gènes surexprimés par le phénotype résistant.

Sp.	Gene Name	IPR Domain	IPR ID	t ₁		t ₂		t ₃		t ₄	
				LFC	<i>p</i> _{value}	LFC	<i>p</i> _{value}	LFC	<i>p</i> _{value}	LFC	<i>p</i> _{value}
-	Ostme11g00750	Sterol desaturase/sterol methyl oxidase	IPR006694	0.489	***	1.037	ns	0.591	ns	-0.133	ns
-	Ostme19g01390	Sterol desaturase/sterol methyl oxidase	IPR006694	0.127	ns	1.397	ns	-0.350	ns	-0.333	ns
Om	Ostme19g01701	Sterol desaturase/sterol methyl oxidase	IPR006694	0.154	ns	0.103	ns	0.321	ns	0.353	ns
-	Ostme06g01310	Methyltransferase type 11	IPR013216	0.363	***	0.263	ns	0.464	ns	0.307	ns
Mam	Ostme06g04730	Tocopherol O-methyltransferase	IPR025774	-0.848	*	-0.398	ns	-0.090	ns	-0.596	ns
-	Ostme15g02500	Tocopherol O-methyltransferase	IPR025774	0.010	ns	0.115	ns	0.073	ns	-0.244	ns
Om	Ostme05g01960	Oxysterol-binding protein	IPR000648	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
-	Ostme09g00040	Oxysterol-binding protein	IPR000648	0.202	**	-0.248	ns	-0.253	ns	-0.230	ns
Om	Ostme14g01170	Oxysterol-binding protein	IPR000648	0.139	ns	-0.092	ns	-0.065	ns	-0.352	ns
Om	Ostme16g02140	Oxysterol-binding protein	IPR000648	-2.254	***	-2.237	***	-2.021	***	-2.062	***

Les oxystérols agissent comme régulateurs sur plusieurs gènes et protéines, mais chez *A. thaliana* ou encore *Ostreococcus* seule la classe des protéines de liaison aux oxystérols (Oxysterol-binding protein – OSBP) a pu être identifiée (Ngo et al., 2010). On recense quatre gènes chez *O. mediterraneus*, dont trois sont spécifiques à l'espèce et ne possèdent pas d'homologues chez les autres Mamiellophyceae (**Tableau 12**). Le gène Ostme09g00040 est l'orthologue d'*ORP3A* chez *A. thaliana* dont la protéine a une affinité de liaison particulière avec le sitostérol et est localisée au niveau de la membrane du RE (Saravanan et al., 2009). Cette protéine est supposée impliquée dans le transport du stérol vers la membrane plasmique (Raychaudhuri et al., 2006). Nous pouvons postuler que la surexpression de ce gène dans la souche sensible serait associée à un transfert accru de sitostérol vers la membrane et probablement vers les radeaux lipidiques auxquels il serait intégré. Le gène Ostme16g02140 est lui très fortement surexprimé (LFC > 2 ; *p*_{value} < 0.05) dans la souche résistante à tous les points d'échantillonnage (**Tableau 12**). En revanche, sa fonction particulière n'est pas connue car il est spécifique à *O. mediterraneus* et ne possède pas d'homologue dans les autres espèces. Un rôle régulateur similaire est supposé qui s'avère être très fortement discriminant et lié au phénotype immunitaire. Les protéines ORPs (Oxysterol binding related proteins) sont des protéines homologues de la famille des OSBPs retrouvées chez diverses espèces dont l'humain ou encore *A. thaliana* (Jaworski et al., 2001; Umate, 2011). Des expériences *in vitro* ont révélé une diversité d'ORP chez *Saccharomyces cerevisiae*, chacune capable de réaliser une réaction spécifique, comme la capture de phospholipides comme l'acide phosphatidique, la

phosphatidylsérine ou encore des phosphoinositol-monophosphates (PI4P) (Schulz et al., 2009; Wang et al., 2005). Les ORP5 et 8 chez l'humain affichent également une affinité pour la PS en plus des stérols. Ces deux protéines assurent l'échange de lipides au niveau de la membrane plasmique, réalisant le transfert de PS vers la membrane plasmique à la place du PI4P (Chung et al., 2015). La PS est majoritairement localisée au niveau de la face interne de la membrane plasmique où elle joue un rôle dans la localisation des protéines et la transduction de signaux intra- et extra-cellulaires (Kay and Fairn, 2019). La régulation de la teneur membranaire en PI4P permet également de contrôler la teneur en phosphoinositol-diphosphates (PI(4,5)P2) dont ils dérivent.

Si les raisons biologiques de l'action des protéines de liaison aux oxystérols OSBPs et de leurs homologues OPRs ne sont pas encore bien définies, elles semblent largement impliquées dans le transfert de divers lipides (phospholipides et stérols) en lien avec la membrane plasmique. Ces flux induisent probablement des changements structurels membranaires qui pourraient avoir un impact direct sur le phénotype.

Les stérols ont ainsi possiblement un rôle déterminant dans le phénotype immunitaire, tant d'un point de vue structurel qu'au travers de la régulation de facteurs d'expression ou de protéines potentiellement impliquées dans l'immunité.

5.4. DU METABOLITE A L'ANNOTATION FONCTIONNELLE D'UN NOUVEAU GENE : LE CAS DES CERAMIDES

5.4.1. BIOSYNTHESE DES CERAMIDES

Le seul métabolite de la classe des sphingolipides dont l'abondance diffère significativement entre les souches sensible et résistante est un céramide d18:1/16:0. Les céramides sont synthétisés à partir de la condensation d'un acide gras, le palmitoyl-CoA, avec une sérine sous l'action de la sérine-palmitoyl-CoA synthase (SPT), dont le gène associé n'est pas différentiellement exprimé (**Figure 55, Tableau 13**). Si la voie de biosynthèse a été caractérisée chez *A. thaliana*, plusieurs gènes n'ont pas pu être identifiés par recherche d'orthologues chez *O. mediterraneus*. C'est le cas de la 3-déhydrospinganine réductase (KSR), de la C4 hydroxylase ou de la $\Delta 4$ -désaturase. En revanche, le gène Ostme09g04594 correspond au gène orthologue *LOH2* chez *A. thaliana* codant pour une céramide synthase (CS). Cette enzyme assure la synthèse de dihydrocéramide d18:0/16:0, très probablement le précurseur du céramide biomarqueur d18:1/16:0. Toutefois la CS est surexprimée dans la

souche sensible et non la souche résistante où le biomarqueur est plus abondant, l'étape discriminante est vraisemblablement au niveau de la désaturation de la chaîne de base du céramide. La désaturation peut intervenir en position $\Delta 4$ ou $\Delta 8$ de la chaîne de base, au travers de l'action de deux enzymes différentes. La recherche de gènes codant pour des désaturases de lipides dans le paragraphe précédent a conduit à identifier une désaturase putative de type $\Delta 6$ -lipide ou $\Delta 8$ -sphingolipide. En effet, bien qu'ayant des substrats préférentiels très différents il n'est pas possible de distinguer sur la base de la séquence nucléotidique ces deux désaturases. Le gène *Ostme02g03560* surexprimé dans le phénotype résistant code possiblement pour une $\Delta 8$ -sphingolipide désaturase. Cette annotation fonctionnelle hypothétique permettrait d'expliquer l'accumulation du céramide d18:1/16:0 dans cette même souche.

Tableau 13. Liste des gènes de la voie de biosynthèse des céramides chez *O. mediterraneus*. LFC : $\text{Log}_2(\text{fold-change})$; p_{value} avec correction de Bonferoni. nt : non transcrit ; ns : non significatif ; *** : $p_{\text{value}} < 0.0001$. LFC > 0 : gènes surexprimés par le phénotype sensible ; LFC < 0 : gènes surexprimés par le phénotype résistant.

Gene Name	Enzyme Name	Enzyme ID	t ₁		t ₂		t ₃		t ₄	
			LFC	p_{value}	LFC	p_{value}	LFC	p_{value}	LFC	p_{value}
Ostme01g04260	Serine-palmitoyl transferase	SPT	-0.284	ns	-0.874	ns	-0.756	ns	-0.448	ns
Ostme09g04594	Ceramide synthase	CS (<i>LOH2</i>)	0.435	***	0.423	ns	0.351	ns	0.129	ns
Ostme02g03560	$\Delta 8$ -sphingolipid desaturase	$\Delta 8$ -Des	-0.390	***	0.137	ns	0.377	ns	-0.011	ns
Ostme11g03431	Glycosylceramide synthase	GCS	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Ostme30g02230	inositolphosphoryl-ceramide glucuronosyl-transferase	IPUT	-13.188	***	-12.789	***	-13.458	***	-12.467	***

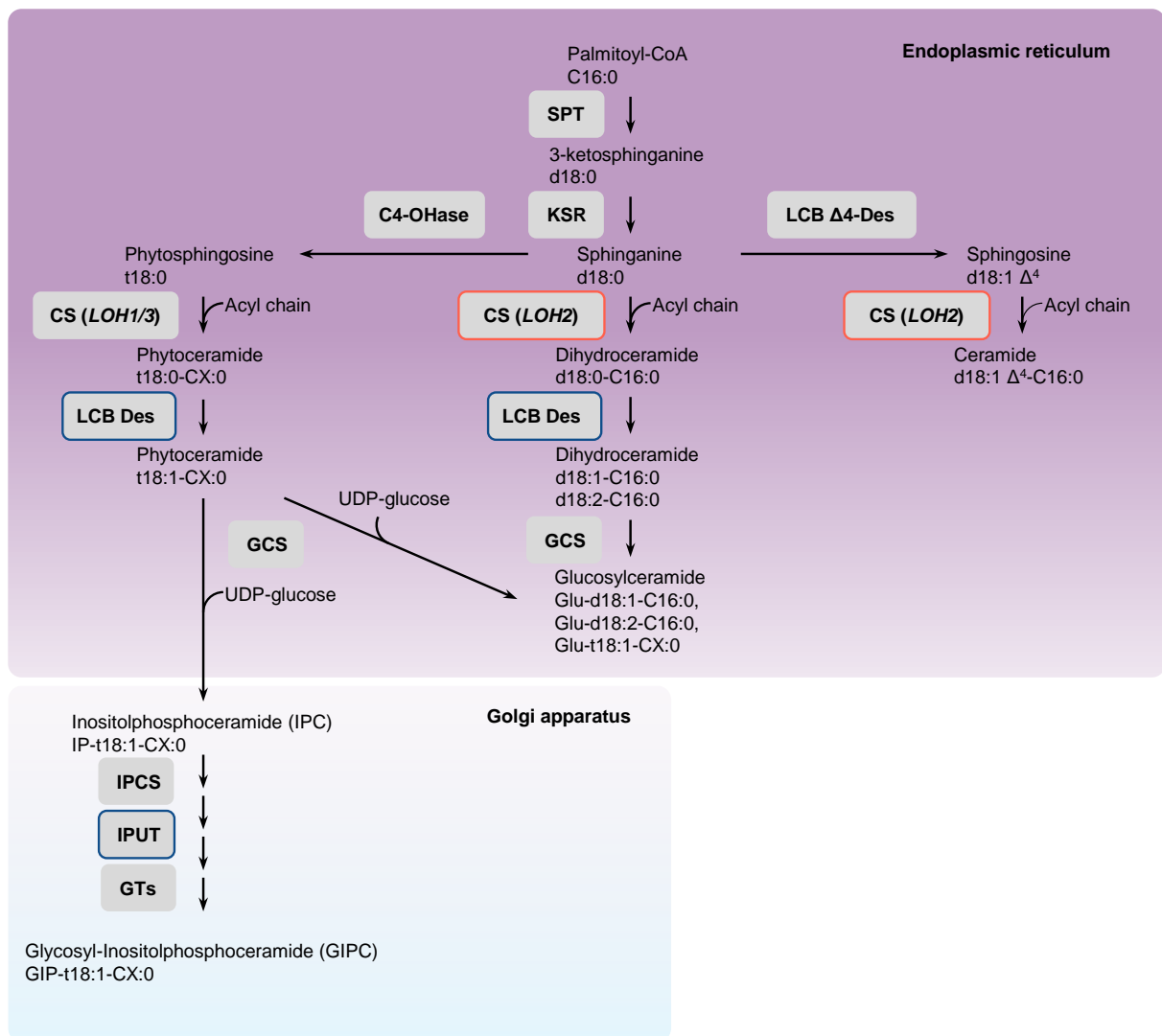


Figure 55. Voie de biosynthèse des céramides proposée chez les plantes (De Bigault Du Granrut and Cacas, 2016). Les cadres de couleur indiquent les gènes surexprimés dans la souche sensible (rouge) et résistante (bleu) à t₁. C4-OHase : C4 hydroxylase ; CS : céramide synthase ; CX : longues chaînes d'acide gras ; GCS : glucosylcéramide synthase ; GTs : glycosyl transférase ; IPCS : inositolphosphoryl-céramide synthase ; IPUT : inositolphosphoryl-céramide glucuronosyl-transférase ; KSR : β-cétoacyl-CoA réductase ; LCB Des : désaturase de longue chaîne de base ; SPT : sérine palmitoyl transférase.

5.4.2. HYPOTHESES BIOLOGIQUES CONCERNANT LE ROLE DES SPHINGOLIPIDES DANS LA RESISTANCE ANTIVIRALE

Afin d'étendre notre compréhension de la voie des céramides chez *O. mediterraneus*, les gènes impliqués dans la glycosylation ont été recherchés. Tout d'abord, le gène codant pour la glucosylcéramide synthase (GCS – Ostme11g03431) assurant le transfert d'un glucose sur

les céramides n'est exprimé par aucune des deux souches de microalgues au cours de l'expérience (**Figure 55, Tableau 13**). Cela soulève la question du rôle d'un tel gène chez l'algue. Il est surprenant qu'un tel gène ne soit pas transcrit à au moins un moment du cycle de vie de l'algue. Son expression est peut-être reliée à des conditions particulières, comme un stress. Pour rappel, les glucosylcéramides sont des constituants du feuillet externe des membranes plasmiques, dont le groupement glucose est exposé à l'espace extracellulaire. Ces composés sont généralement associés à des stérols et des protéines constituant ainsi les fameux radeaux lipidiques (D'Angelo et al., 2013). Les rôles des glucosylcéramides sont nombreux, aussi bien structurels que développementaux et leur implication dans les interactions hôtes-pathogènes en font des molécules particulièrement intéressantes. Très récemment leur implication dans la résistance au virus Influenza A a été démontrée (Drews et al., 2020). En effet, les lignées de cellules mutantes déficientes au niveau de la GCS présentent un phénotype de résistance qui est le résultat de la modification de la composition membranaire en glucosylcéramides empêchant ainsi l'entrée du virus dans les cellules. L'absence d'expression du gène *GCS* chez *O. mediterraneus* aux temps mesurés interpelle et suggère peut-être (i) une expression très ponctuelle au cours du cycle de vie de la cellule ou alors (ii) le gène demeure silencieux ou encore (iii) le gène n'est exprimé qu'en des circonstances particulières. On pourrait penser à son implication dans le cadre d'une infection virale. Compte tenu du rôle de ce gène dans la résistance antivirale il semblerait intéressant d'en étudier la cinétique d'expression dans le système *Ostreococcus*-Prasinovirus et d'estimer son impact sur le phénotype.

Enfin, les céramides trihydroxylés (t18:1) servent de substrat pour la synthèse de glycosyl-inositolphosphoryl-céramide (GIPC), des céramides complexes, constitués de plusieurs sucres et acides organiques (entre 1 et 7). La synthèse de GIPCs est initiée par l'inositolphosphoryl-céramide synthase (IPCS) suivie de l'inositolphosphoryl-céramide glucuronosyl-transférase (IPUT). Les glycosyl transférases assurant les étapes suivantes n'ont encore jamais été identifiées. Chez *O. mediterraneus* le gène putatif codant pour l'IPCS n'a pas été identifié contrairement à l'IPUT et la GCS. Ces deux derniers gènes sont spécifiques à *O. mediterraneus* et n'ont pas d'homologues chez les Mamiellophyceae. Il est probable que les séquences aient fortement évolué expliquant la difficulté à identifier une séquence orthologue à l'IPCS chez *O. mediterraneus*. Ainsi, le gène Ostme30g02230 localisé sur le chromosome SOC codant potentiellement pour l'IPUT est fortement surexprimé dans la souche résistante (**Tableau 13**) car il n'est pas exprimé dans la souche sensible aux 4 temps d'analyse considérés.

Comme pour la glucosylation des céramides, l'expression du gène codant pour l'IPUT est peut-être ponctuelle et/ou décalée dans le temps entre les deux souches ou tout simplement absente chez le phénotype sensible.

Le rôle des différentes glycosyltransférases (GCS, IPCS, IPUT etc...) est essentiel dans la signalisation, la régulation de nombreux mécanismes cellulaires et la réponse aux stress. La mort cellulaire programmée (PCD) est notamment dépendante de l'activité de l'IPCS chez *A. thaliana* (Wang et al., 2008). En effet, son inactivation conduit à l'accumulation de céramides dans les cellules induisant l'accumulation parallèle d'espèces réactives de l'oxygène induisant la mort cellulaire (Bi et al., 2014). Ce mécanisme n'est d'ailleurs pas propre à l'IPCS puisque l'inactivation de la protéine kinase ACD5 (Accelerated Cell Death) et de la protéine de transfert de sphingosine ACD11 assurant respectivement la phosphorylation et l'export hors de l'appareil de Golgi de céramides conduit irrémédiablement à l'accumulation de ceux-ci et à la PCD. L'induction de cette voie en conditions d'infection *in vivo* a été mise en avant dans le couple *A. thaliana-Pseudomonas syringae* (Greenberg et al., 2000). Par la suite il a été également démontré que la surexpression de *LOH2* s'accompagnait d'une accumulation de céramides de type d18:0-16:0 et d'acide salicylique (SA) ce qui avait pour effet d'induire l'expression constitutive des gènes de la réponse hypersensible (HR) conduisant à la PCD (Luttgeharm et al., 2015). La régulation du contenu en céramides libres semble essentiel pour le maintien de l'intégrité cellulaire. Les gènes associés possèdent un rôle fondamental dans la réponse immunitaire aux pathogènes, les variations d'expression observées traduisent potentiellement une différence dans la capacité de réponse des deux souches au virus.

La membrane plasmique ne forme pas qu'une simple barrière avec le milieu extérieur, elle se trouve surtout être une interface et le lieu de la transduction de tous les signaux provenant de cet environnement extracellulaire. La perception des agents pathogènes intervient généralement au travers de la reconnaissance par la cellule hôte de récepteurs spécifiques induisant une cascade de signalisation et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée. Il se trouve que certains récepteurs viraux sont incorporés à la membrane au niveau des radeaux lipidiques, des structures de petite taille enrichies en GIPCs, et dans une moindre mesure en GlcCer, liés à des stérols et hébergeant une grande variété de protéines transmembranaires. Ces structures s'avèrent indispensables pour l'entrée du virus dans la cellule. Des expériences *in vivo* de déplétion de lignées cellulaires hôtes en glycosphingolipides et/ou cholestérol montrent une diminution drastique de l'entrée et de la production de particules virales chez les virus enveloppés Semliki Forest Virus (SFV) et Sindbis Virus (SIN) (Phalen and Kielian, 1991).

Cette dépendance vis-à-vis des céramides et du cholestérol dépend du type de virus puisque le cycle infectieux de VSV (Vesicular Stomatitis Virus) n'est pas perturbé lors d'expériences similaires de carence (Lu and Kielian, 2000).

Les récepteurs hôtes à de nombreux virus enveloppés sont localisés au niveau des radeaux lipidiques comme le récepteur GLUT-1 (Glucose Transporteur 1) du rétrovirus HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus Type I) (Maeda et al., 2015), le récepteur FR α (Folate Receptor α) du virus Ebola (Simmons et al., 2003), le récepteur CR2 de l'hépatite B (Takahashi and Suzuki, 2011) ou encore le récepteur CD46 de l'Herpès Virus 6 (HHV-6) (Tang et al., 2008). La localisation spécifique des récepteurs viraux au niveau des microdomaines est aussi observée pour les virus non enveloppés comme le Simian Virus 40 et l'Echovirus de Type 1 (Chazal and Gerlier, 2003).

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer le rôle des glycosphingolipides dans l'interaction hôte-virus. Ils agiraient au travers d'interactions ioniques faibles avec la membrane virale, favorisant l'adhésion des particules et le déplacement de celles-ci vers les récepteurs hôte (Lorizate and Krausslich, 2011). Dans le cas des virus enveloppés, ceux-ci sont dirigés vers des récepteurs et sites où la membrane libère la particule virale (*uncoating*). Ce mécanisme a été étudié chez le Coxsackie B Virus (Picornavirus à ARN responsable de méningites et myocardites) qui reconnaît le récepteur DAF (Decay-Accelerating Factor), une protéine ancrée dans la membrane au travers de GPIC au niveau des radeaux lipidiques (Shieh and Bergelson, 2002). La reconnaissance du récepteur DAF par le virus induit une cascade de signalisation (activation de la tyrosine kinase ABL puis de la GTPase Rac) provoquant une réorganisation de la membrane hôte et facilitant l'accès du virus au récepteur hôte CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor). Cette dernière étape provoque une dépolarisation de la membrane virale et l'accès de la capsid à de nouveaux récepteurs membranaires permettant au virus de continuer son cycle infectieux (Coyne and Bergelson, 2006). Ces exemples illustrent l'implication des GIPCs membranaires liés aux stérols dans le déroulement du cycle infectieux viral. Des changements structurels liés au contenu en sphingolipides s'avèreraient être une stratégie de défense astucieuse de l'hôte afin d'échapper à un virus infectieux. Une part de cette stratégie réside peut-être dans la capacité de l'organisme à moduler son métabolisme, ce qui nécessite sans doute la coordination de nombreux facteurs de régulation agissant sur les gènes ou encore les protéines. De telles différences structurelles sont très probablement constitutives entre deux phénotypes ou alors elles impliqueraient la mise en place d'une réponse extrêmement rapide

entre la perception des premiers signaux viraux et le changement de la composition chimique de la membrane.

Les différences transcriptionnelles et métaboliques des sphingolipides sont évidemment à mettre en lien avec les observations faites sur le modèle hôte-virus *E. huxleyi*-EhV, malgré la très grande distance évolutive entre la lignée verte et les haptophytes. En effet, le génome viral d'EhV code pour une voie de biosynthèse de sphingolipides atypiques, produisant des sphingolipides à chaîne plus courte et à nombre impair d'atomes de carbone (Ziv et al., 2016). Ces séquences virales sont naturellement exprimées par l'hôte lors de l'infection et les sphingolipides atypiques servent à la constitution de la membrane interne du virus. Ces sphingolipides inhabituels qui composent la membrane du virus jouent un rôle essentiel dans l'assemblage, la structure et l'infectivité du virus (Malitsky et al., 2016). Chez *E. huxleyi* comme chez le VIH et le virus de l'hépatite C, les sphingolipides déterminent la localisation subcellulaire du virus dans la cellule hôte et notamment son bourgeonnement (sortie) au niveau des radeaux lipidiques de la membrane de la cellule hôte (Brugger et al., 2006; Mackinder et al., 2009; Sakamoto et al., 2005). Chez *E. huxleyi*, les radeaux lipidiques hébergent plusieurs protéines dont une calmoduline et la protéine TIR-NB-LRR (*Toll Interleukin 1 Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat*) impliquée dans la reconnaissance des membranes virales et l'induction de la réponse hypersensible caractérisée par l'induction de la mort cellulaire programmée chez les plantes (Heath, 2000). D'autre part une extensine riche en proline (*Prolin-Rich Extensin*) a été identifiée, son activation signale une déformation de la membrane cellulaire lors de l'entrée d'un pathogène dans la cellule hôte (Sanabria et al., 2010).

Les données accumulées sur les sphingolipides associés aux stérols dans les radeaux lipidiques témoignent de leur rôle fondamental dans l'immunité antivirale (Bukrinsky et al., 2020). En perspective de ces connaissances, les différences transcriptionnelles et métaboliques observées chez *O. mediterraneus* autour du métabolisme lipidique suggèrent un processus très similaire. Celui-ci témoignerait d'un mécanisme adaptatif dans le contexte de l'évolution de la « course aux armements » métabolique entre l'hôte et son virus façonnant ainsi l'interaction et assurant la coexistence du système hôte-virus.

6. CONCLUSION

L'approche intégrative a permis de mettre en évidence les congruences entre les données transcriptomiques et métaboliques pour les voies de biosynthèse de différentes

classes de lipides au cours du temps et entre souches. Ce travail a également révélé l'importance des choix méthodologiques dans le traitement des données. En effet, les critères de sélections employés pour discriminer les gènes et métabolites biomarqueurs du phénotype immunitaire ne permettaient pas de faire de lien entre les deux niveaux d'expression. Les gènes les plus fortement différentiellement exprimés ne codent pas pour les métabolites biomarqueurs annotés. La synthèse de ces derniers est associée à des variations d'expression plus faibles (Log_2 fold change ± 0.2 à 1) de certains gènes entre souches. Certains gènes biomarqueurs n'ont pas pu être associés à des variations métabolomiques. Deux hypothèses se présentent : soit les ARN messagers ne sont pas traduits activement et n'ont donc aucun effet sur le métabolisme (régulation post-transcriptionnelle) soit la classe de métabolites associée à ces gènes biomarqueurs n'a pas été criblée ou discriminée par notre protocole d'analyse métabolomique. En effet, les données transcriptomiques suggèrent des différences marquées entre souches au niveau de la glycosylation. Celle-ci concerne sans doute des éléments membranaires (protéines, lipides, sphingolipides) possiblement localisés dans des structures de type microdomaines insolubles que nous n'avons pas pu isoler et analyser d'après notre méthode. Cette perspective sera discutée dans la conclusion générale de la thèse.

Ce travail a permis de décrire pour la première fois le paysage transcriptomique et métabolomique de phénotypes immunitaires sensibles et résistants d'*O. mediterraneus* au virus OmV2. Ainsi, il a également été possible de mettre en évidence la similitude des fonctions et des schémas d'expressions des gènes codés sur le SOC partagée avec *Ostreococcus tauri*. Confirmant une nouvelle fois l'implication de ce chromosome *outlier* dans l'immunité et les stratégies de défense possiblement mises en place par les espèces du genre *Ostreococcus*. Ce travail a également permis, au travers de l'analyse métabolomique, de faire émerger le rôle possible de différents métabolites comme les lipides, les sphingolipides et les stérols (et des gènes associés) dans le profil immunitaire de l'algue. Enfin, grâce à l'approche intégrative une annotation fonctionnelle a été proposée pour le gène codant pour une $\Delta 8$ -sphingolipide désaturase.

De nouvelles questions ont été soulevées et impliquent de préciser le rôle et la dynamique des différents marqueurs génétiques et métaboliques de l'immunité chez *O. mediterraneus*. L'étude métabolomique du modèle *Ostreococcus*-Prasinovirus au travers d'une cinétique d'infection virale détaillerait les changements métaboliques qui interviennent au cours du cycle infectieux. Cela permettrait de mettre en évidence les leviers utilisés par l'algue pour sa défense ou contrôler la production virale dans le cas des souches résistantes

productrices. L'étude du métabolisme hôte sensible au virus aiderait à préciser le rôle des gènes viraux car l'annotation de ceux-ci demeure peu informative. L'outil métabolomique est très prometteur pour l'étude du système *Ostreococcus*-Prasinovirus puisqu'il permettra compléter l'étude des gènes et leur rôle dans fonctionnement de la cellule lors de cette interaction.

7. MATERIELS & METHODES

Conditions de culture

Les microalgues utilisées pour ce projet sont des souches résistantes et sensibles d'*Ostreococcus mediterraneus* RCC2590 (Roscoff Culture Collection) issues de lignées clonales sélectionnées par (Krasovec et al., 2017b; Yau et al., 2020). Les microalgues ont été cultivées en eau de mer artificielle supplémenté en milieu K modifié (K-ASWO). Ce milieu contenait 420 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 20 mM de MgCl₂, 10 mM de CaCl₂, 25 mM de MgSO₄, 2.5 mM de NaHCO₃, 0.88 mM de NaNO₃, 5.0×10⁻⁵ M de NH₄Cl, 1.0×10⁻⁵ M de β-glycérophosphate, 1.0×10⁻⁸ M de H₂SeO₃, 1 mL de Tris-HCl à 1 M (pH 7.2) par litre de milieu, 3.7×10⁻¹⁰ M de cyanocobalamine, 2.0×10⁻⁹ M de biotine and 3.0×10⁻⁷ M de thiamine en plus de la solution d'oligoéléments du milieu K. Les microalgues ont été inoculées à une densité de 1.0×10⁵ cellules.mL⁻¹ dans des flacons de culture cellulaires ventilés T75 contenant 200 mL de milieu de culture K-ASWO, puis maintenues à 20°C en cycle lumineux alternatif 12/12 (jour/nuit) à 100 μE.m⁻².s⁻¹.

Axénisation des cultures

Toutes les cultures ont été préalablement traitées avec un complexe d'antibiotiques afin de réduire le développement bactérien. Les quantités suivantes d'antibiotiques ont été ajoutées au milieu de culture K-ASWO : 50 μg.mL⁻¹ d'ampicilline (A9518, Sigma-Aldrich), 50 μg.mL⁻¹ de gentamycine (G1914, Sigma-Aldrich), 20 μg.mL⁻¹ de kanamycine (60615, Sigma-Aldrich), and 100 μg.mL⁻¹ de néomycine (N6386, Sigma-Aldrich). Après deux repiquages cellulaires, l'abondance bactérienne a pu être maintenu en dessous de 1% de l'abondance microalgale.

Suivi de la croissance cellulaire par cytométrie de flux

Les cellules sont préalablement fixées par ajout de glutaraldéhyde (0.25% concentration finale, G6257, Sigma-Aldrich) et de Pluronic F-68 (0.1% concentration finale, P-7061, Sigma-Aldrich) pendant 15 min à l'obscurité puis marqué avec l'agent intercalant SYBR Green I (LON50512, Ozyme) pendant 15 min supplémentaires à l'obscurité. Le comptage cellulaire a

été réalisée sur un cytomètre de flux Beckman Coulter (longueur d'onde du laser d'excitation : 488 nm) par mesure de l'autofluorescence de la chlorophylle pour les microalgues (filtre de détection : > 620 nm) et par mesure de la fluorescence du SYBR Green I pour les bactéries (bande de détection de 525-540 nm, correspondant au canal de l'isothiocyanate de fluorescéine – FITC). Les données ont été analysées avec le logiciel CytExpert 2.2 (Beckman Coulter).

Extraction ARN et séquençage

Les cultures ont été échantillonnées 8 jours après repiquage. Pour l'extraction ARN, 100 mL de culture cellulaire ont été récoltés par centrifugation à 8000 g pendant 10 min à 20°C, le culot cellulaire est re-suspendu en tube de 2 mL puis recentrifugé à 8000 g pendant 4 min à 20°C. Les ARNs totaux ont été extraits grâce au kit Direct-zol RNA MiniPrep (R2052, Zymo Research) et analysé pour contrôle qualité par Bioanalyzer 2100 (Agilent). La sélection des ADN polyadénylés, la préparation des bibliothèques et le séquençage ont été réalisés par Rémy Merret, Laboratoire de Génomique et Développement des Pantès, Université de Peprignan. Chaque échantillon a été concentré à 1000 ng d'ARN total puis traité avec le kit NEBNext Ultra Directional RNA et chaque banque a été amplifiée avec 10 cycles de PCR. Toutes les banques ont été multiplexées puis séquencées sur un NextSeq550 en Paired End 2x101 paires de bases sur une flow cell HighOutput.

Analyse des données de séquençage ARN

L'analyse qualité des séquences brutes de 101 paires de bases (fragments ou *reads* en anglais) a été réalisée avec FastQC v0.11.7. TrimGalore v0.6.5 a été utilisé pour le « nettoyage » des séquences : c'est-à-dire enlever les adaptateurs de séquençage et les extrémités 3' (10 paires de bases) et 5' (15 paires de bases) des *reads*. L'index et l'alignement des *reads* sur le génome de référence d'*O. mediterraneus* a été réalisé avec STAR v2.6.0c. Les mesures d'expression brute (*reads*/gènes) ont été réalisées avec le logiciel RSEM v1.3.0 et les mesures d'expression normalisées par millions de bases (ou TPM : Transcripts Per Million) ont été calculées avec TPMCalculator v0.0.2. L'ensemble des scripts d'analyse bio-informatique avec les paramètres utilisés est disponible en matériel supplémentaire (**Supplementary scripts**).

Analyse différentielle des transcrits

L'analyse de l'expression différentielle des gènes a été réalisée d'après la matrice de comptage brute grâce au paquet DESeq2 v1.26 en environnement R 3.6.2. La transcription des gènes a été comparée entre chaque souche pour chaque temps d'analyse. L'expression du

transcrit est considérée significativement différente entre deux souches si la p_{value} ajustée < 0.1 . Un gène est considéré comme exprimé si au moins 100 *reads* sont alignés sur le gène.

Extraction des métabolites

Les microalgues ont été collectées 8 jours après repiquage par filtration de 100 ml de milieu de culture sur filtre Whatman GF/F (Z242519, Sigma-Aldrich) sous vide (600 mb). Les filtres ont été placés dans des tubes en verre avec 7 mL d'acétate d'éthyle puis broyés avec une tige en verre dans le but de solubiliser les microalgues. Le solvant des extraits a été directement évaporés puis les extraits secs ont été conservé à -80°C avant analyse.

Analyses métabolomique par UHPLC-HRMS

Les extraits de microalgues ont été analysés par chromatographie liquide haute pression sur un système UHPLC Dionex Ultimate 3000 couplé à un spectromètre de masse Orbitrap MS/MS FT Q-Exactive Focus Thermo Scientific. Les échantillons ont été solubilisés dans du MeOH ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) et $1 \mu\text{L}$ a été injecté pour séparation sur la colonne Phenomenex Luna Omega Polar C18 (150 2,1 mm, 1,6 m, 100 \AA) conditionnée à 42°C . La phase mobile était un mélange d'eau (solvant A) avec une proportion croissante d'acétonitrile (solvant B, 012041, Biosolve), les deux solvants étant modifiés avec 0.1% d'acide formique. Le gradient était le suivant : 50% B de 3 min avant l'injection à 1 min après ; entre 1 et 3 min, une augmentation linéaire de B jusqu'à 85%, suivie de 85% B pendant 2 min ; 89% B de 5.1 à 7 min ; 93% B de 7.1 à 10 min ; 97% B de 10.1 à 13 min ; et enfin, 100% B de 13.1 à 18 min. Le débit a été réglé à $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et injecté dans le spectromètre de masse 1 min après l'injection (détourné avant). Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées en mode d'ionisation par électrospray positif dans la gamme de 133.4 à 2000 Da, et les spectres de masse ont été enregistrés en mode centroïde. La méthode du spectromètre de masse a été réglée sur le mode MS2 data dependent FullMS. Dans le cas de la méthode FullMS, la résolution a été fixée à 70 000 et la cible AGC à 3×10^6 pour une largeur de pic chromatographique (FWHM) de 6 s. Dans le cas de la méthode MS2, la résolution était de 17 500, la cible AGC de 1×10^5 , la fenêtre d'isolation de 0.4 Da et l'énergie de collision normalisée par paliers de 15/30/45 avec 10 s d'exclusion dynamique. La masse de verrouillage a été calibrée sur l'ion $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})^{2+}$ à m/z 144.9821 Da.

Analyse des données LC-MS

Les chromatogrammes d'ions totaux (TIC : Total ion chromatograms) des 12 extraits d'algue ont été analysés avec le logiciel MS-Dial v4.16. Le programme effectue la correction des temps de rétention, la détection des composés inconnus et le regroupement des

échantillons ; il détecte les ions absents (gaps filling) ; il masque le bruit de fond (à partir du *blanc*) ; et enfin, il prédit la composition élémentaire des composés. La fenêtre de temps de rétention a été fixée à 2-17 min. Le décalage temporel maximal pour l'alignement des composés était de 0.1 min, la tolérance de masse maximale pour le regroupement des composés et le calcul de la composition élémentaire était de 3 ppm, et l'intensité minimale du pic était de 1×10^6 . La version 67 de la base de données de spectre MS² de lipide implémentée dans MS-Dial a été utilisée pour la prédiction des composés lipidiques. La matrice d'observations/variables fournissant l'aire sous la courbe des ions alignés (ou *features* en anglais) dans chaque échantillon a été utilisée pour conduire différentes analyses statistiques. Les histogrammes et graphiques en nuages de points ont été construits grâce aux fonctions implémentées dans le paquet ggplot2. Les chromosomes et les valeurs de surexpression des gènes sur le chromosome SOCC ont été tracés grâce au paquet chromPlot v1.16.

Analyses statistiques univariées et multivariées

Les analyses statistiques et les figures ont été réalisées en environnement R 3.6.2. Les analyses différentielles d'abondance d'ions entre souches aux temps d'analyse t_1 et t_3 ont été conduites en réalisant un test de comparaison de moyenne de Student. L'abondance de l'ion est considérée significativement différente entre deux souches si la valeur de la $p_{\text{value}} < 0.05$. Les analyses en composantes principales (ACP) ont été construites avec le paquet FactoMineR v1.42 et la fonction PCA avec données centrées réduites et ellipses de confiance à 95%.

CHAPITRE IV – ANALYSE METABOLOMIQUE DU VIRUS OMV2

RESUME

Ce chapitre porte sur l'analyse métabolomique du virus OmV2 infectant *Ostreococcus mediterraneus*. Ce travail préliminaire a permis d'identifier des métabolites viraux atypiques qui témoignent du profond remodelage métabolique intervenant lors de l'infection et qui constitueraient d'excellents marqueurs pour l'identification et l'étude du système *O. mediterraneus*-OmV2 en environnement naturel.

Ce travail a été rendu possible grâce à la contribution d'Alice Rodrigues qui a réalisé l'extraction et l'analyse LC-MS du métabolome viral.

1. INTRODUCTION

Le phytoplancton marin est à la base des réseaux trophiques aquatiques et responsable de la moitié de la production primaire sur terre (Behrenfeld, 2001). Ce phytoplancton est caractérisé par une immense diversité taxonomique mais globalement dominé par les procaryotes cyanobactériens et les microalgues eucaryotes diatomées et dinoflagellées (de Vargas et al., 2015). Récemment, il a été mis en avant la prévalence de certaines microalgues de la lignée verte au niveau des régions océaniques côtières lors du programme OSD (*Ocean Sampling Day*) de séquençage ADN d'échantillons environnementaux (Tragin and Vaultot, 2019). Cette étude a démontré la très vaste distribution géographique des espèces de la classe des Mamiellophyceae, qui dominent la fraction picoeucaryote (diamètre des cellules $<3 \mu\text{m}$) (Massana, 2011) de ces régions côtières où elles possèdent une position écologie clé. Le phytoplancton possède un taux de renouvellement extrêmement rapide, on estime qu'une population entière est renouvelée chaque semaine (Field, 1998). Cette dynamique est façonnée, entre autres facteurs, par les virus marins dont on estime qu'ils sont responsables du quart du renouvellement des populations phytoplanctoniques (Suttle, 2007; Wilhelm and Suttle, 1999). Leur impact sur les flux métaboliques et de matière est donc colossal, court-circuitant et redirigeant la matière organique vers les réseaux trophiques inférieurs (Fuhrman, 1999). Par ailleurs, les virus marins sont à l'origine de transferts de gènes entre espèces hôtes ce qui contribue à la diversification et l'adaptation du phytoplancton (Weynberg et al., 2017). En

parallèle, il est supposé que de nombreux gènes viraux sont hérités de leur hôte chez les grands virus à ADN comme les Prasinovirus infectant les Mamiellophyceae (Gilbert et al., 2016). Ces échanges ne se limitent pas aux gènes, l'infection donne naissance à un nouveau type d'état métabolique appelé *virocell* qui résulte de la modulation du métabolisme cellulaire hôte au travers de l'interaction et de l'expression des gènes métaboliques auxiliaires viraux (*virus-encoded auxiliary metabolic genes* – vAMGs) (Forterre, 2013). Le virus contribue ainsi activement au métabolisme en le modulant mais aussi en proposant de nouvelles voies métaboliques (innovations métaboliques). Ce concept a été étudié au sein du modèle d'interaction hôte-virus *Emiliania huxleyi*-EhV où le virus a acquis de son hôte plusieurs gènes qui ont évolués et codent pour une voie de biosynthèse de sphingolipides alternative à celle de l'hôte. Lors de l'infection, ces gènes viraux sont fortement exprimés ; l'enzyme initiatrice de la voie, une sérine palmitoyl-CoA transférase (SPT), présente une préférence de substrat inhabituelle pour le pentadécanoyl-CoA (C15) (au lieu d'hexadécanoyl-CoA – C16) ce qui conduit à la synthèse de sphingolipides dont la chaîne de base possède un nombre impair d'atomes de carbone et est surtout plus courte. Ces sphingolipides inhabituels sont des marqueurs de l'infection et des constituants membranaires majeurs de l'enveloppe interne du virus (Rosenwasser et al., 2014; Vardi et al., 2009; Ziv et al., 2016). Les Prasinovirus ne contiennent pas de telle voie métabolique mais possèdent plusieurs gènes associés au métabolisme des acides aminés et du glucose, dont des glycosyltransférases fortement exprimées durant le cycle infectieux d'*Ostreococcus tauri* Virus 5 (OtV5) (Derelle et al., 2018). Cependant, les voies d'action de ces enzymes virales demeurent pour le moment inconnues. Par ailleurs, la membrane interne des Prasinovirus est *à priori* synthétisée et héritée de leur hôte. Les mécanismes de recrutement et d'assemblage de la membrane hôte dans la capsid virale demeurent peu décrits. Pour certains Prasinovirus, l'acquisition de la membrane externe à lieu au moment de la sortie par bourgeonnement de la particule virale. En effet dans le modèle EhV, la composition membranaire du virus reflète celle de son hôte au lieu de sortie (Rose et al., 2014). Bien que les composés détectés dans la membrane hôte et virales puissent être les mêmes, des différences de proportions sont observées, suggérant que les constituants membranaires viraux dérivent de compartiments cellulaires ou encore de zones membranaires différents (Brugger et al., 2006; Fulton et al., 2014; Scheiffele et al., 1999). Les radeaux lipidiques, des microdomaines membranaires, enrichis en stérols et sphingolipides, hébergeant de nombreuses protéines transmembranaires et récepteurs viraux, s'avèrent être des sites de bourgeonnement privilégiés pour certains virus (Bukrinsky et al., 2020; Chazal and Gerlier, 2003).

Ici, nous présentons la première analyse métabolomique préliminaire de Prasinovirus réalisée sur la souche *Ostreococcus mediterraneus* Virus 2 (OmV2). Son hôte est la souche sensible d'*Ostreococcus mediterraneus* précédemment étudiée dans ce manuscrit. Le milieu de lyse, dépourvu de particules virales, aussi appelé *virus free lysat* (VFL) a été analysé afin d'en soustraire le signal dans l'analyse du métabolome viral. Les observations seront mises en perspectives avec les données lipidomiques acquises sur la microalgue hôte et discutées d'après la littérature.

2. RESULTATS & DISCUSSION

L'analyse métabolomique du virus a été conduite sur un extrait viral liquide très concentré (150×10^9 particules/mL). L'analyse parallèle du milieu de lyse (VFL) a permis de soustraire le signal non lié au virus. Ainsi, sept métabolites ont été retenus de cette analyse différentielle (**Tableau 14**). De manière remarquable, deux métabolites isomères inconnus (**5** et **6**) constituent les composés majoritaires de l'extrait (**Figure S32**), malheureusement l'analyse de leur spectre de masse n'a pas permis de proposer d'annotation. Seul le composé **2** qui est un céramide d13:1/9:0 et les isomères **3** et **4** correspondant à des digalactosyl diacylglycérols (DGDGs) de type 32:4 ont pu être annotés.

Tableau 14. Liste des métabolites du virus OmV2.

Comp.	Souche	t_R (min)	m/z	Annotation	Adduit	Formule brute [M]	Classe
1	Virus	3.49	376.2595	Inconnue	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₃ N ₃ O ₃	NA
2	Virus	6.60	392.3136	Cer d13:1/9:0	[M+Na] ⁺	C ₂₂ H ₄₃ NO ₃	Céramide
3	Virus	9.85	885.3690	DGDG 32:4 isomère 1	[M+H] ⁺	C ₄₉ H ₅₆ O ₁₅	Galactolipide
4	Virus	9.92	885.3690	DGDG 32:4 isomère 2	[M+H] ⁺	C ₄₉ H ₅₆ O ₁₅	Galactolipide
5	Virus	10.40	338.1757	Inconnue isomère 1	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₃ NO	NA
6	Virus	10.53	338.1757	Inconnue isomère 1	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₃ NO	NA
7	Virus	16.25	1012.3046	Inconnue	NA	NA	NA

Annotation et rôles fonctionnels du céramide d13:1/9:0

Le composé **2** a pu être annoté comme un céramide d13:1/9:0 (**Figure 56, Figure S33**). La longueur de la longue chaîne de base (LCB) à 13 atomes de carbones et celle de la chaîne d'acide gras à 9 atomes de carbones sont tout à fait inhabituelles. En effet, chez les plantes la chaîne de base possède généralement 18 atomes de carbones et la chaîne acyle qui varie très souvent en taille est comprise entre 16 et 26 atomes de carbone (Mashima et al., 2020; Michaelson et al., 2016). Il paraît évident que le céramide annoté ici émerge d'une voie biosynthétique atypique qui n'est vraisemblablement pas exprimée en temps normal chez l'hôte puisque ce métabolite est absent des analyses métabolomiques d'*O. mediterraneus* (données non montrées). Outre une longueur de LCB et de chaîne acyle réduite, le nombre impair d'atomes de carbones pour chacune d'entre elles interpelle. Pour rappel, la LCB et la chaîne acyle dérivent classiquement de la même voie de biosynthèse : celle des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone. *A contrario*, les acides gras à nombre impair d'atomes de carbones proviennent de voies atypiques : ils sont synthétisés à partir de propionyl-CoA (CH₃-CH₂-CO-CoA) un précurseur à trois atomes de carbone, contrairement à l'acétyl-CoA utilisé habituellement (CH₃-CO-CoA). Par ailleurs, le catabolisme des acides aminés à chaîne latérale ramifiée comme la leucine, l'isoleucine ou encore la valine participe à la production de propionyl-CoA et *in fine* alimente la synthèse d'acides gras à chaîne impair comme en témoignent des expériences de radiomarquage (Crown et al., 2015). L'origine biosynthétique de ce céramide n'est évidemment pas connue mais l'hypothèse qu'il provienne d'éléments précurseurs issus d'acides aminés n'est pas incongrue. En effet, chez *O. tauri* le métabolisme des acides aminés est probablement modifié lors de l'infection car plusieurs gènes viraux associés à ce métabolisme prennent l'ascendant sur l'expression des gènes hôte (Derelle et al., 2018). Un dosage des acides aminés serait nécessaire pour évaluer les changements qui interviennent lors de l'infection et cela permettrait de préciser l'hypothèse de départ. Le virus peut induire une redirection ou une augmentation de certains flux métaboliques en modulant l'expression des gènes hôte ou en substituant les enzymes hôtes par des enzymes virales *via* les vAMGs (Rosenwasser et al., 2016). Cela se traduit par des innovations métaboliques au profit du virus. La synthèse du céramide d13:1/9:0 pourrait émerger d'une telle stratégie. Enfin, l' α -oxydation est un aussi l'un des mécanismes qui assure la synthèse d'acides gras à nombre impair d'atomes de carbone par raccourcissement de la chaîne carbonée d'un atome de carbone du côté de la fonction carboxyle (Dowd, 2012).

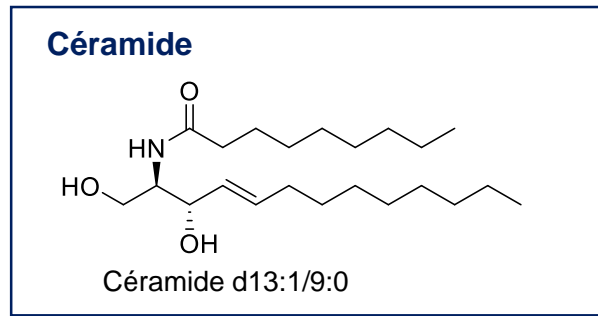


Figure 56. Structure proposée pour le céramide d13:1/9:0

En définitive, plusieurs stratégies existent mais il est vraisemblable que l'une d'entre elles seulement soit utilisée par le virus. Dans tous les cas elle nécessite très probablement une réorientation du métabolisme hôte vers la synthèse de propionyl-CoA, et le détournement de chaînes acyles impaires courtes par la sérine palmitoyl-CoA transférase (SPT) et la céramide synthase (CS) hôte. La coordination de l'ensemble de ces événements demeure bien entendu inconnue tout comme le mécanisme qui induit le changement d'affinité de substrat des enzymes hôtes.

Ce résultat fait écho au système hôte-virus *E. huxleyi*-EhV. Chez l'algue haptophyte cette originalité métabolique est codée presque entièrement par le génome viral (Fulton et al., 2014; Ziv et al., 2016). En effet, plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse des sphingolipides sont codées par le génome viral et se substituent à celles de l'hôte lors de l'infection. L'enzyme clé de cette voie est la SPT virale qui possède une affinité particulière pour le pentadécanoyl-CoA (C15:0-CoA) et synthétise ainsi la formation de LCBs à 17 atomes de carbone. Les LCBs sont ainsi plus courtes d'un atome de carbone et constituent un marqueur chimique d'origine virale (Fulton et al., 2014). L'expression de cette SPT virale est absolument essentielle à l'assemblage du virus car elle assure la synthèse des glycosphingolipides incorporés à la membrane des virions (Fulton et al., 2014; Schleyer et al., 2019; Vardi et al., 2009). Le virus OmV2 d'*O. mediterraneus* ne code pas sa propre SPT, c'est donc bien celle de l'hôte qui est mobilisée lors de l'infection, mais son affinité de substrat est totalement modifiée.

Le céramide d13:1/9:0 est supposé être un constituant de la membrane interne du virus. À la suite de l'ancrage de la particule virale à la cellule hôte et de la décapsidation, cette membrane virale entre en contact puis fusionne avec la membrane plasmique hôte. Ces étapes ont été décrites en détail chez le Phycodnavirus *Paramecium bursaria Chlorella Virus-1* (PBCV-1) qui infecte certaines algues vertes du genre *Chlorella*. Les étapes et les mécanismes d'infection sont supposés être similaires chez les virus d'*Ostreococcus*, et de manière plus large,

conservés au sein des Phycodnavirus. Dans le contexte de l'infection virale, nous proposerons quelques hypothèses concernant les propriétés physico-chimiques et donc biologiques des céramides à chaîne acyle courte. Ceux-ci ont pour propriétés de fluidifier (ou désordonner) les membranes plasmiques. En effet, la fluidité d'une membrane est dépendante de sa composition en lipides et protéines. La **Figure 57** rappelle les différents états de fluidité des membranes plasmiques selon leur composition. Ainsi, des expériences menées sur différents types de cellules animales ont révélé que les céramides à chaîne courte avaient pour effet d'accroître systématiquement la diffusion latérale des constituants membranaires. Autrement dit, ils perturbent l'arrangement des lipides de la phase liquide ordonnée de la membrane (*Lo : liquid ordered phase*) et augmentent la fluidité membranaire (Chiantia et al., 2007). En augmentant la diffusion, les céramides à chaîne courte diminuent également la séparation des phases *Lo* des phases liquides désordonnées (*Ld : liquid disordered phase*), ce qui se traduit par une dispersion au sein des différentes phases des protéines habituellement rassemblées dans la phase *Lo* (Gidwani, 2003; Holowka et al., 2018). Ces changements de dynamique membranaire et de localisation spatiale des protéines viennent perturber le fonctionnement de celles-ci. Holowka et al., (2018) ont mis en avant le rôle inhibiteur des céramides à chaîne courte dans la signalisation calcique (*calcium signaling/calcium mobilization*). Sans entrer dans les détails, cela se traduit par l'absence de transduction de certains signaux cellulaires.

Ces expériences fournissent quelques hypothèses concernant le rôle possible de ce céramide à chaîne courte. En effet, celui-ci peut participer à augmenter la fluidité de la phase liquide ordonnée de la membrane plasmique hôte lors de l'entrée en contact des deux membranes, favorisant leur fusion. Cette fusion est une étape absolument fondamentale puisqu'elle signe l'entrée du virus dans la cellule, et souligne le rôle potentiellement crucial de ce métabolite dans l'infection virale. Par ailleurs, les changements structuraux générés par le céramide pourraient perturber le fonctionnement des protéines et la transduction des signaux membranaires comme l'ont montré Holowka et al., (2018). Ce mécanisme pourrait servir aussi bien à bloquer la mise en place d'une réponse immunitaire qu'à bloquer la fusion de nouvelles particules avec la membrane hôte. En effet, les images de microscopie suggèrent que parmi des dizaines de virus ancrés à la membrane hôte, seules quelques particules sont capables de fusionner avec celle-ci (Derelle et al., 2006). Après l'entrée d'un ou quelques virus la membrane pourrait être modifiée de sorte qu'aucune autre particule ne puisse entrer. Ce mécanisme sélectif assurerait ainsi une réplication optimale du premier virus adsorbé par la cellule.

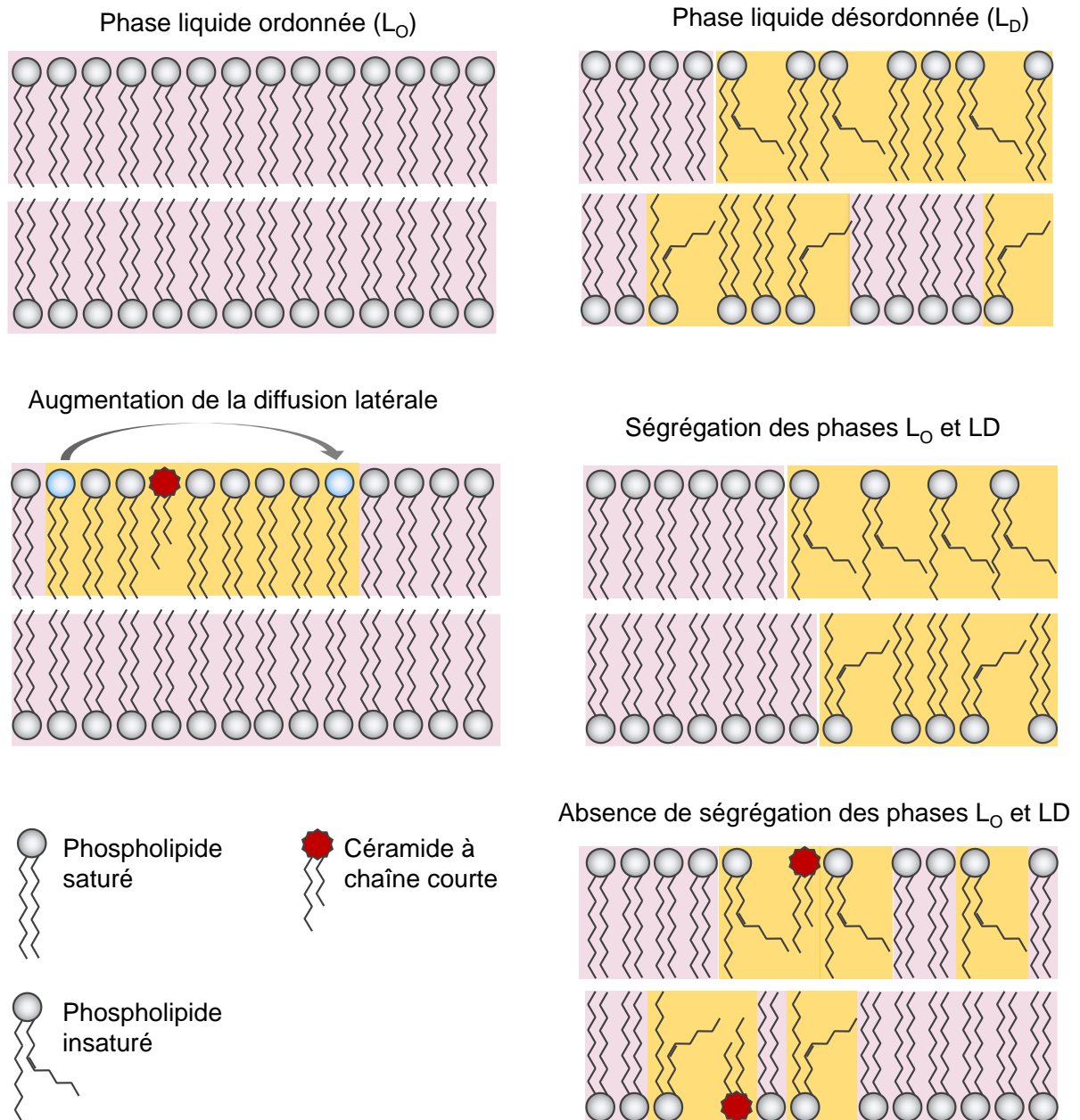


Figure 57. Modèle des différents types de phase de la membrane plasmique. En rose la phase liquide ordonnée constituée de phospholipides saturés, en jaune la phase liquide désordonnée constituée de phospholipides insaturés.

Annotation et rôles fonctionnels des DGDGs 32:4

Les composés **3** et **4** ont été annotés comme deux digalactosyl diacylglycérols de type 32:4 mais les spectres de masse ne permettent pas de déterminer la longueur et la disposition des chaînes. De manière surprenante, l'ion m/z à 885.3690 correspondant au DGDG 32:4 est absent des différents profils chromatographiques d'*O. mediterraneus*. Cela indique que les

différentes espèces de DGDGs 32:4, comme le DGDG 18:4/14:0 pourtant détecté comme un galactolipide majoritaire par Degraeve-Guilbault *et al.* (2017) chez *O. mediterraneus*, ne sont pas produites (ou en dessous des limites de détection de l'appareil) par l'algue dans le travail présent. Comme pour le céramide, ces DGDGs 32:4 doivent être produits lors de l'infection. Les DGDGs ont une conformation spatiale de type cylindrique et forment préférentiellement des structures lamellaires de type bicouche lipidique et s'intègrent parfaitement aux membranes plasmiques (da Costa *et al.*, 2016). Ce mécanisme a été largement décrit et intervient notamment lors de carence nutritive en phosphate. Les phospholipides des membranes plasmiques sont remplacés par les DGDGs qui ont des propriétés structurales similaires (Jouhet *et al.*, 2004). L'utilisation de DGDGs par le virus est peut-être une stratégie de moindre coût. En utilisant des constituants dont la synthèse ne dépend pas d'éléments rares dans les environnements oligotrophes, le virus optimise ses chances de réplication et de propagation.

3. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Cette analyse métabolomique du virus est un travail préliminaire. Il avait pour vocation d'éprouver le protocole d'extraction et d'analyse des métabolomes viraux mais aussi du milieu de lyse. Sept métabolites propres au virus ont pu être identifiés et annotés. Les premiers résultats sont encourageants car ils mettent en évidence une signature lipidique hétérogène (galactolipides et céramide). Plusieurs hypothèses intéressantes entourent le rôle de ces composés dans la fusion des membranes et la perturbation de la transduction des signaux cellulaires. Toutefois, quatre métabolites demeurent inconnus dont deux sont les constituants majoritaires de l'extrait. Ce travail demeure préliminaire notamment d'un point de vue expérimental concernant le protocole d'extraction du métabolome viral. En effet, compte tenu de la forte concentration virale de l'échantillon, la quantité d'extrait obtenue est trop faible. Le protocole d'extraction utilisé est donc trop peu efficace. Nous avons réalisé une extraction à l'acétate d'éthyle sur un échantillon de virus en suspension dans l'eau de mer. L'acétate d'éthyle et l'eau étant non miscibles et les virus très hydrophiles, nous pensons que le solvant n'a pu perméabiliser correctement la capsidie protéique et solubiliser la membrane lipidique interne du virus. Nous avons pensé à mettre en place un nouveau protocole d'extraction qui implique d'isoler par ultracentrifugation les particules virales de l'extrait, prélever et filtrer sur membrane de 100 kDa (Schatz *et al.*, 2017). Ainsi, nous pourrions solubiliser les particules virales fixées sur le filtre comme cela a été éprouvé par les auteurs ci-dessus. Un autre protocole

prévoit l'utilisation d'un agent perméabilisant des membranes (type chaotrope) afin de déstabiliser la capsidie protéique.

L'objectif de ce projet est de réaliser la première analyse métabolomique d'un Prasinovirus. Ce travail permettra de révéler la composition lipidique complète de la membrane interne du virus et d'apporter un éclairage sur les voies métaboliques hôte essentielles à la réplication virale et de connaître ainsi les leviers métaboliques de la résistance hôte. Ces données pourront être abondamment comparées au Cocolithovirus d'*E. huxleyi* et permettront de compléter le paysage des stratégies infectieuses des Phycodnavirus et de comprendre l'évolution de la « course à l'armement » métabolique entre l'hôte et son virus.

4. MATERIEL & METHODES

Culture d'O. mediterraneus sensible, lyse virale et échantillonnage du virus et du lysat sans virus

La souche sensible d'*O. mediterraneus* a été cultivée dans deux bouteilles en verre de deux litres chacune sous bullage continu en eau de mer artificielle supplémenté en milieu Keller (K-ASWO). Les cultures ont été maintenues à 15°C en cycle lumineux alternatif 12/12 (jour/nuit) à 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Après 14 jours la culture de microalgue a atteint une forte densité cellulaire et le virus OmV2 a pu être inoculé. La lyse cellulaire est réalisée en cinq jours. Les lysats cellulaires ont été filtrée en série sur filtres en polyéthylène sulfone (PES, Millipore) de porosité décroissante (5, 3, 0.8, 0.45 et 0.2 μm) afin d'éliminer tous les débris cellulaires. Les 4 litres de lysats viraux ont été concentrés par filtration en flux tangentiel sur membrane de 30 kDa afin d'obtenir un volume final de 50 mL. Par ailleurs, 3,950 litres de lysat sans virus (VFL) ont été récupérés.

Extraction des métabolites viraux et du lysat sans virus

15 mL de solution virale et de lysat sans virus ont été extraits dans un volume équivalent d'acétate d'éthyle par sonication pendant 15 minutes. La phase organique (acétate d'éthyle) a été récupérée, évaporée puis concentrée à 1mg/mL dans le MeOH pour analyse.

Analyses métabolomique par UHPLC-HRMS

Le protocole d'analyse est identique à celui du chapitre III (Cf p. 148).

Analyse des données LC-MS

Les chromatogrammes d'ions totaux (TIC : Total ion chromatograms) ont été analysés avec le logiciel Compound Discoverer 2.1 (ThermoScientific). Les paramètres du logiciel sont identiques à ceux du chapitre II (*Cf p. 77*). Le signal chromatographique de l'extrait de lysat sans virus a été soustrait au signal chromatographique du virus.

CHAPITRE V – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE LA THESE

Chapitre I – Introduction

Dans le premier chapitre de cette thèse, l'introduction, nous avons défini les concepts généraux de notre sujet d'étude qui portent sur l'étude de l'interaction biologique hôte-virus chez l'algue verte *Ostreococcus mediterraneus* et son virus associé OmV2. Pour cela nous avons abordé les contextes évolutifs des deux entités, décrit leurs caractéristiques biologiques et leurs fonctions écologiques et enfin rassemblé les connaissances connues à ce jour sur les mécanismes immunitaires des modèles phytoplanctoniques étudiés. Les éléments de connaissance apportés dans cette partie ont permis de confirmer l'originalité et l'intérêt du choix des modèles biologiques dans l'étude et la compréhension de l'interaction. La sélection d'un modèle ayant divergé très tôt au sein de la lignée verte et des algues marines représente l'opportunité de décrire des mécanismes très anciens et/ou conservés d'un point de vue évolutif.

Chapitre II – Article 1 : Metabolomic insights into marine phytoplankton diversity

Le deuxième chapitre traite de la diversité métabolique des algues vertes de la classe des Prasinophyceae et du potentiel de l'approche métabolomique pour rendre compte fidèlement de la divergence évolutive du phytoplancton à l'échelle du métabolome. Cela confirme le potentiel de la chimiotaxonomie comme outil de caractérisation et de discrimination des microalgues.

L'approche holistique utilisée a permis de couvrir plusieurs classes de composés lipidiques et pigmentaires mais nous n'avons pas cherché à caractériser l'ensemble des molécules de chaque classe. Les analyses métabolomiques ciblées et exhaustives (caractérisation complète d'une classe de composés) reposent généralement sur la comparaison des profils chromatographiques à une base de données (temps de rétention et spectres MS² provenant de composés caractérisés et de standards analytiques) afin d'accélérer et d'aider à l'identification des composés (Abida et al., 2015; da Costa et al., 2019; Degraeve-Guilbault et al., 2017). Une telle approche aurait pu être envisagée pour la caractérisation complète du glycérolipidome ou des pigments des microalgues. Une caractérisation extensive des stérols et des composés terpéniques en général demeure plus complexe au vu de la diversité des

molécules appartenant à ces classes. Les caractérisations lipidomiques exhaustives menées sur plusieurs algues modèles ou d'intérêt agronomique se sont avérées intéressantes d'un point de vue évolutif, car elles ont permis l'identification de biomarqueurs spécifiques à certaines classes d'algues, reliant la composition chimique à l'histoire évolutive des espèces. Les exemples sont multiples, brièvement nous pouvons citer parmi eux : l'acide hexadécatétraénoïque ($16:4\Delta^{4,7,10,13}$) est un marqueur de la lignée verte, absent chez le phytoplancton issu de la lignée rouge (Khozin-Goldberg, 2016; Lang et al., 2011). *A contrario* les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (C20, C22) sont absents chez la majorité des Chlorophytes et la lignée verte alors que quelques Mamiellales sont capables de synthétiser de l'acide docosahéxaénoïque (DHA, $22:6\Delta^{4,7,10,13,16,19}$) révélant une histoire évolutive moins linéaire et plus complexe (Degraeve-Guilbault et al., 2017; Dunstan et al., 1992). Les profils lipidiques de plusieurs microalgues du genre *Ostreococcus* sont maintenant connus mais une caractérisation exhaustive pour les espèces basales comme *Nephroselmis* sp. ou *Pyramimonas* sp. permettrait de préciser le paysage évolutif de la voie métabolique des lipides à la base de la lignée verte. Les espèces de la lignée *Pyramimonas* font partie d'une branche ayant divergé très tôt dans l'évolution de la lignée verte.

Chapitre III – Approche intégrative : du transcriptome au métabolome pour comprendre la régulation des gènes sur le métabolisme cellulaire dans le cadre de la résistance antivirale

Le troisième chapitre porte sur la caractérisation de biomarqueurs génétiques et métaboliques de l'immunité antivirale chez *Ostreococcus mediterraneus* au virus OmV2. Ce travail repose sur l'analyse différentielle de l'expression des gènes et de l'abondances de métabolites de souches de microalgues résistantes et sensibles à OmV2 sur une période de 12h en cycle jour/nuit. Environ 2.5% des gènes (194 gènes) sont systématiquement différentiellement exprimés entre les souches et plus de 95% d'entre eux (186 gènes) sont localisés sur le chromosome *outlier* SOC suspecté jouer un rôle dans l'immunité chez les *Mamiellophyceae*. Plusieurs glycosyltransférases et gènes en lien avec les éléments transposables sont surexprimés par le phénotype résistant, suggérant une aptitude à modifier le degré de glycosylation de certains constituants cellulaires (protéines, structures cellulaires), et probablement une plasticité génomique plus forte liée phénotype. L'analyse métabolomique révèle que l'abondance relative de 68 composés lipidiques et pigmentaires varie entre souches. Galactolipides oxydés et composés terpéniques oxydés sont plus abondants dans le phénotype sensible. D'ailleurs, la comparaison des données transcriptomiques et métabolomiques révèle

une corrélation entre l'expression des gènes associés au métabolisme des galactolipides et des stérols et les composés de ces voies métaboliques. Toutefois, cette corrélation n'est observée qu'à t_1 (2h après le début de la phase claire). Ces résultats démontrent que les premières heures de la phase claire sont les plus discriminantes entre souches et sont probablement décisives dans l'établissement du phénotype immunitaire.

Ce travail intégratif est le premier du genre dans le cadre de l'étude de phénotypes immunitaires chez les *Mamiellophyceae*. Il a permis d'identifier des marqueurs génomiques et métaboliques associés aux phénotypes immunitaires.

Par la suite, il serait intéressant de préciser le rôle de ces marqueurs dans l'établissement de la résistance antivirale. Un suivi transcriptionnel et métabolique au travers d'une expérience d'infection permettrait de comprendre la **dynamique** de ces **marqueurs** lors de la **production de particules virales** ou de la **lyse**. Une expérience similaire a été réalisée chez l'algue *Emiliania huxleyi* au travers d'une approche *single-cell* (Ku et al., 2020). Celle-ci a permis de décrire chez l'algue sept états physiologiques distincts associés aux différentes phases de l'infection et de préciser ainsi les changements métaboliques intervenant à chaque phase de l'infection, comme la surexpression des gènes associés au métabolisme des lipides induite précocement lors de l'infection. Si la résistance antivirale peut être associée à une modification des récepteurs viraux, il existe chez *Ostreococcus* des souches résistantes productrices de virus (Thomas et al., 2011). Un tel phénotype exige sans doute une régulation fine de certaines voies métaboliques, notamment celles impliquées dans la synthèse des lipides (stérols, sphingolipides...), afin de maintenir un état physiologique qui permette de concilier production de particules virales et survie de la microalgue. Afin de répondre à cette problématique les profils transcriptomiques et métabolomiques de cultures infectieuses peuvent être respectivement analysés par séquençage ARN en *single-cell* (MARS-seq : massively parallel single-cell RNA-sequencing) (Keren-Shaul et al., 2019) et spectrométrie de masse couplé à un système de microfluidique pour l'analyse *single-cell* (Pedde et al., 2017; Sun et al., 2018). L'infection virale n'intervient jamais de manière totalement synchronisée sur tous les individus d'une population ; le profilage de cellules uniques permettrait de capter les différentes phases de l'infection et la réponse spécifique de chaque individu. Ainsi, on préciserait notre compréhension de la cinétique d'infection virale et la ou les différentes réponses immunitaires mises en place par les individus d'une population.

Comme énoncé plus haut, l'autre enjeu de l'étude de la résistance antivirale est la description de l'interaction hôte-virus au niveau membranaire. Les données sont rares à ce sujet pour le modèle *Ostreococcus*-Prasinovirus mais plusieurs ressemblances avec le système *Chlorella-Paramecium bursaria* Chlorella Virus-1 (PBCV-1) mieux étudié ont conduit à établir plusieurs hypothèses intéressantes concernant le cycle de vie des virus d'*Ostreococcus*. Des observations au microscope électronique à transmission ont révélé la formation de couronnes et d'agrégats de particules d'OtV5 autour de cellules sensibles d'*O. tauri* peu de temps après infection (moins de 5 min) (**Figure 58**). Le mécanisme permettant d'expliquer une telle rapidité dans la rencontre et l'adhésion des deux partenaires n'est pas connu. La présence d'une matrice ou de structures entourant la membrane cellulaire hôte capables de retenir les particules virales est suspectée (Derelle et al., 2008). Cette hypothèse est confortée par l'observation à l'œil nu d'agrégats filamenteux de cellules d'*Ostreococcus* se formant au cours du temps si les flacons de culture ne sont pas agités régulièrement.

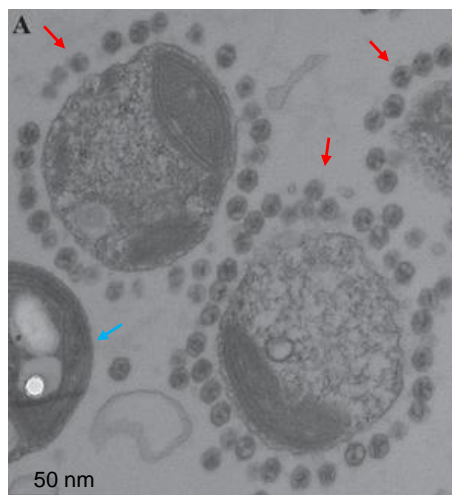


Figure 58. Observation au microscope électronique à transmission de cellules d'*Ostreococcus tauri* et du virus OtV5. Les flèches rouges indiquent les cellules entourées de particules virales et la flèche bleue désigne une cellule n'interagissant avec aucune particule virale (Bellec and Desdevises, 2015).

Chez le virus PBCV-1 ce sont des protéines fibrillaires (vraisemblablement glycosylées) localisées dans le complexe protéique de capsid mineur (*minor capsid protein*) qui assurent l'ancrage de la particule virale à la surface de la paroi cellulaire de *Chlorella vulgaris* (Van Etten et al., 1991; Zhang et al., 2011) (**Figure 59**). L'observation de particules virales ancrées à *Ostreococcus* au microscope électronique à transmission selon la méthode *freeze-etch* permettrait de révéler davantage de détails sur la nature de l'interaction qu'établit la particule virale avec son hôte. L'objectif est de déterminer s'il existe un ancrage similaire à celui de

PBCV-1 avec *Chlorella*. Par ailleurs, cette méthode de microscopie renseignerait sur la structure de la membrane au site de contact hôte-virus. Par exemple, l'adhésion de PBCV-1 se fait au niveau de zones très granuleuses de la membrane.

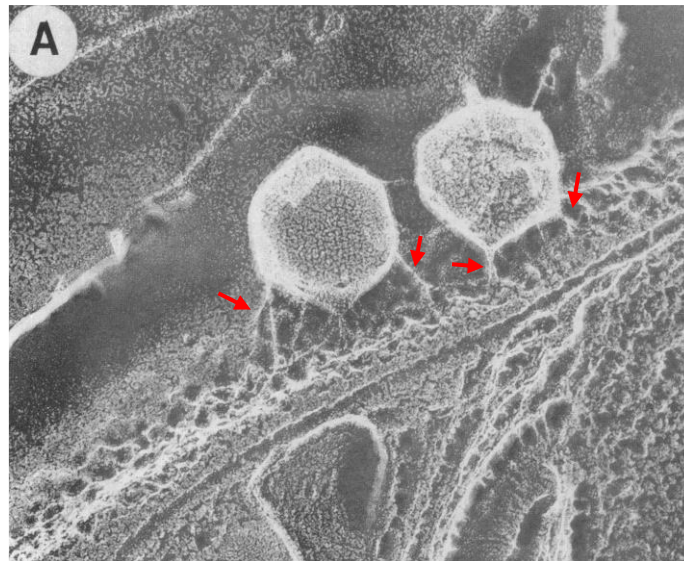


Figure 59. Observation au microscope électronique à transmission de virus PBCV-1 ancrés à la paroi cellulaire de *Chlorella vulgaris*. L'échantillon a été analysé d'après la méthode *deep-etch electron-microscopy*. Les flèches rouges montrent les protéines filamenteuses virales ancrées à la paroi cellulaire (Van Etten et al., 1991).

A ce sujet, il serait intéressant d'étudier plus finement la composition membranaire des différents phénotypes immunitaire *via* l'outil métabolomique et l'analyse notamment des radeaux lipidiques. Comme énoncé plus haut, ces structures sont très souvent impliquées dans l'interaction virale. Ces microdomaines membranaires peuvent inclure les récepteurs viraux, sont des sites de localisation et de transduction de messages viraux et de vésiculation (Bieberich, 2018). Plusieurs méthodes ont été développées pour l'étude des radeaux lipidiques (Klymchenko and Kreder, 2014). L'approche observationnelle par microscopie optique à fluorescence ou microscopie à force atomique est non destructive et permet de décrire la répartition de ces structures sur la membrane (Gajate and Mollinedo, 2020). L'approche analytique par spectrométrie de masse permet une analyse qualitative et quantitative des constituants des radeaux lipidiques. Mais cette méthode nécessite la purification préalable des membranes plasmiques puis la séparation et la purification des radeaux lipidiques par ultracentrifugation sur gradient de sucrose et solvant Triton X-100 (perméabilisant membranaire). La fraction du gradient contenant les radeaux lipidiques est récupérée puis solubilisée pour analyse. Un protocole de fractionnement cellulaire a déjà été développé pour

l'analyse du protéome d'*O. tauri* (Le Bihan et al., 2011) tandis que les protocoles de purification de radeaux lipidiques et de leur analyse lipidomiques chez les plantes sont largement éprouvés (pour revue (Cacas et al., 2012)). De telles analyses ont été menées sur le modèle *Emiliania huxleyi*-EhV et ont révélé l'ancrage et l'entrée du virus EhV au niveau de ces radeaux lipidiques mais aussi le bourgeonnement (sortie) des nouvelles particules à ce même endroit (Rose et al., 2014).

Une caractéristique des virus d'*Ostreococcus* et plus largement des Phycodnavirus et la présence d'une ou plusieurs enveloppes lipidiques internes sous la capsidie protéique (Mackinder et al., 2009; Milrot et al., 2017; Schatz et al., 2014; Van Etten et al., 2020). Chez PBCV-1 ou EhV cette enveloppe interne joue un rôle clé lors de l'infection puisqu'elle fusionne avec la membrane cellulaire hôte et forme un « conduit » permettant l'injection de l'ADN viral dans le cytoplasme. La localisation et les mécanismes qui entourent la synthèse de cette membrane dans la cellule hôte sont encore mal connus. Chez *E. huxleyi* les virions nouvellement assemblés migrent vers la membrane plasmique où ils acquièrent leur double membrane lipidique. Ce processus se ferait en association avec les gouttelettes lipidiques dont le nombre augmente fortement lors de l'infection sous l'effet de l'accumulation de TAG saturés (Hunter et al., 2015; Malitsky et al., 2016; Schleyer et al., 2019). En effet, les gouttelettes lipidiques serviraient de substrat à la formation de vésicules à double membrane (*double membrane vesicles*, DMVs) apparentés à des autophagosomes. Il se trouve que le rôle de ces DMVs a été mis en avant dans la production de particules virales (Schatz et al., 2014). L'autophagie est un mécanisme par lequel la cellule séquestre et dégrade du matériel cellulaire. Cela implique la production de DMVs (équivalent des autophagosomes des cellules animales), l'estérification de la protéines Atg8 avec la phosphatidyléthanolamine (PE), la liaison d'Atg8-PE avec les DMVs afin d'initier leur fusion avec les vacuoles (qui contiennent les enzymes de lyse) et la dégradation du matériel. Lors de l'infection virale les marqueurs de l'autophagie sont fortement induits chez *E. huxleyi* : production accrue de DMVs, surexpressions des gènes associés à ce processus dont celui codant pour Atg8. Une inhibition de l'induction de l'autophagie durant l'infection virale se traduit par une diminution du nombre de virions produits. Les DMVs et les vacuoles participeraient au recrutement des membranes pour leur association avec la capsidie virale mais aussi à l'intégration de l'ADN viral dans la capsidie. En effet, si la réplication de l'ADN viral n'est pas affectée, son empaquetage dans les capsides néoformées n'est plus réalisé. L'autophagie, alors habituellement un mécanisme d'élimination des constituants cellulaires et de défense antivirale est détourné par le virus d'*E. huxleyi* pour

réaliser son cycle infectieux. Chez *O. tauri* les gènes associés à l'autophagie comme celui codant pour Atg8 (Ostta01g05650) ne montrent aucune différence d'expression lors de la cinétique d'infection, suggérant que ce mécanisme ne rentre visiblement pas en compte pendant l'interaction virale (Derelle et al., 2018).

Dans l'étude des différents phénotypes immunitaires d'*O. tauri* et lors des expériences de suivi d'infection relativement peu d'attention a été portée sur le métabolisme des lipides. Pourtant celui-ci est central dans le déroulement du cycle infectieux de nombreux virus. Comme énoncé plusieurs fois au cours de ce manuscrit les sphingolipides, les glycosylcéramides ou encore les galactolipides jouent probablement un rôle essentiel dans la définition du phénotype immunitaire. Mais en plus de ces différentes classes chimiques de lipides il serait très intéressant de s'intéresser aux lipides neutres, TAGs et ainsi que les structures qui en découlent comme les gouttelettes lipidiques ou autres DMVs, notamment parce que ces différentes structures participent à l'élaboration de ce que l'on appelle les usines à virions (*viral factories*) : un site dans le cytoplasme, à proximité du noyau et du RE où sont recrutées différentes membranes, vésicules et gouttelettes lipidiques créant une structure de réplication et d'assemblage viral. Ces structures ont mobilisé beaucoup d'efforts de recherche chez le virus de l'hépatite C dont la réplication a lieu dans ces structures. Après l'entrée du virus dans la cellule, une accumulation de gouttelettes lipidiques est observée, celles-ci migrent à proximité du RE dont les membranes, par coalescence avec différentes vésicules dont les DMVs, s'étendent et finissent par entourer les gouttelettes lipidiques. Les mécanismes de régulation qui sous-tendent la succession de ces différents événements restent incomplets mais quelques étapes ont pu être décrites. En référence à la **Figure 60**, l'enroulement des membranes du RE autour des gouttelettes lipidiques (*lipid droplets*, LD) nécessite l'activité de la réplicase virale. Les protéines virales NS5A (*non structural protein 5A*) et core assure le recrutement des LDs tandis que NS5A et la protéine Rab8 s'associent pour assurer l'enroulement de la membrane du RE autour de la gouttelette lipidique. Les protéines d'enveloppe virale E1/E2 et core sont localisées dans la membrane du RE où elles vont encapsider l'ARN viral pour former le virion. Le processus de formation d'usines à virions est relativement bien décrit pour le virus de l'hépatite C et met en évidence le rôle essentiel des vésicules, DMVs et gouttelettes lipidiques dans la réplication de ce virus. Dans ce contexte, il paraît essentiel d'étudier la structure, la localisation et la dynamique des différents types de vésicules chez *Ostreococcus* dans le cadre de l'infection virale car cela n'a jamais été fait. Il se trouve qu'*O. tauri* est une algue riche en TAG qui les produit même en conditions de culture standards (non carencées). Des expériences

de carences nutritives en azote ont révélé une forte accumulation de lipides neutres (TAGs) se traduisant par une profusion de gouttelette lipidiques cytoplasmique mais aussi leur sécrétion en-dehors de la cellule sous forme de « gousses » entourées d’une membrane phospholipidique (Smallwood et al., 2018). Ces formations sont tout à fait inédites mais leur fonction reste inconnue. En conditions de stress, biotique ou abiotique, l’accumulation de lipides neutres et la production de vésicules est un mécanisme conservé chez les microalgues. L’étude des vésicules (gouttelettes lipidiques, gousses lipidiques, DMVs) lors de l’infection virale serait un travail pionnier chez *Ostreococcus* qui permettrait de préciser leur rôle dans le cadre de cette interaction.

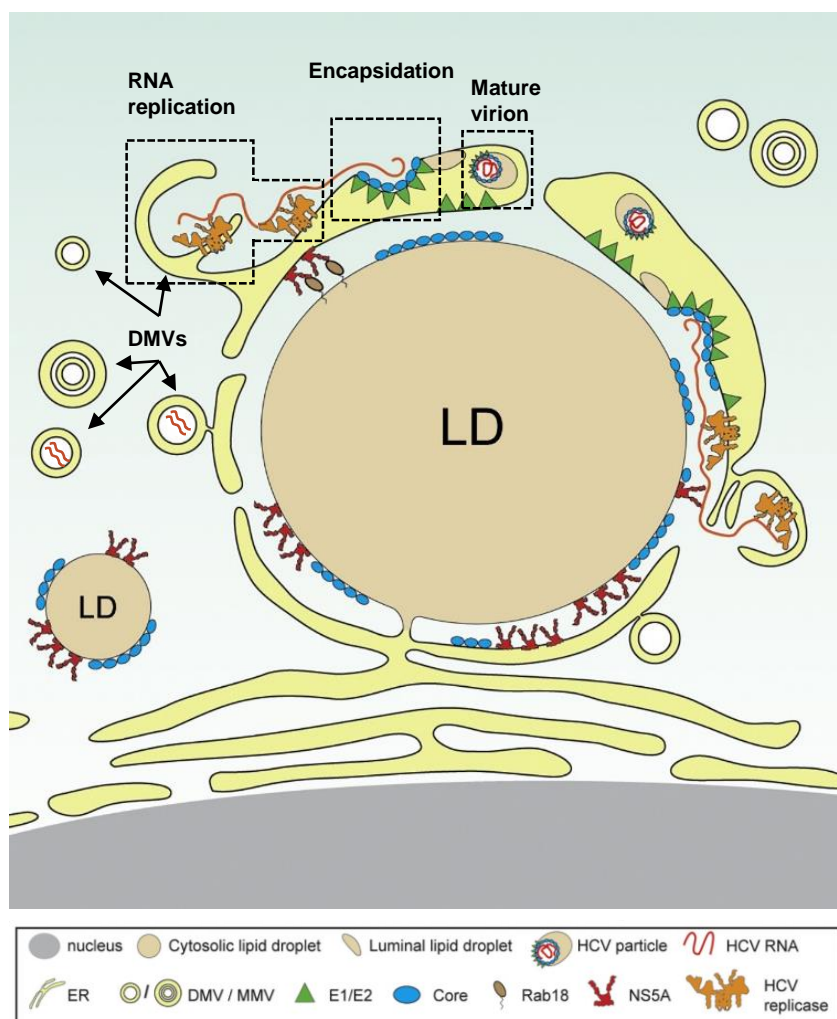


Figure 60. Schéma de réplique du virus de l’hépatite C (HCV) en lien avec les gouttelettes lipidiques (LD) et les vésicules à double membranes (DMV) (Lee et al., 2019).

Les perspectives proposées reposent sur des approches observationnelles et analytiques complémentaires. Elles permettraient de porter notre attention sur des structures comme la membrane hôte ou les vésicules dont le rôle a été plusieurs fois confirmé dans d’autres modèles

hôte-virus. Elles auraient pour objectif d'offrir une vision précise de la répartition et de la composition de ces structures à l'échelle de la cellule. L'étude de souches résistantes et sensibles au virus permettrait d'identifier les différences structurelles associées aux phénotypes, tandis que ces observations lors d'expériences d'infection offriraient une idée de la dynamique de ces structures lors de l'interaction hôte-virus.

Enfin, des données générées pour ce chapitre n'ont pas encore traitées. En effet, le transcriptome et le métabolome d'une souche d'*O. mediterraneus* résistante productrice de virus ont été acquis parallèlement à ceux de la souche résistante et sensible. Les analyses différentielles révèlent des profils d'expression de gènes et une variation du métabolome très différents et bien plus marqués pour cette souche par rapport aux phénotypes résistant strict et sensible. Par ailleurs, tous les gènes viraux sont exprimés aux différents temps d'analyse. Ces résultats préliminaires sont très prometteurs car ils témoignent d'un phénotype complexe dont les gènes et le métabolome sont influencés par l'interaction avec le virus.

Chapitre IV – Analyse métabolomique du virus OmV2

Dans le quatrième chapitre de ce manuscrit nous avons présenté les résultats préliminaires de l'analyse métabolomique du virus OmV2. L'objectif était de caractériser la composition lipidique de la membrane interne du virus et de mettre en perspective ces résultats avec l'analyse lipidomique de l'hôte. L'étude métabolomique du virus présente encore quelques verrous expérimentaux et défis mais se présente très prometteuse. En effet, nous espérons par ce biais mettre en évidence des marqueurs lipidiques de l'infection virale. Nous espérons pouvoir comparer ces résultats aux profils lipidiques de souches résistantes et sensibles au virus afin de préciser les stratégies métaboliques de la résistance.

Conclusion générale

Ce projet de thèse a eu pour objectif de décrire pour la première fois **le paysage métabolique de la résistance antivirale** chez une algue de la classe des Mamiellophyceés. La mise en perspective avec les données d'expression des gènes a permis d'offrir une **vision intégrative de l'immunité, du gène au métabolite**. Ce travail vient étendre les champs disciplinaires d'études des mécanismes immunitaires chez les Mamiellophyceés. Les résultats très prometteurs confirment l'intérêt d'étudier l'interaction hôte-virus à l'échelle moléculaire

car ce niveau permettra de révéler une grande partie des mécanismes responsables de l'immunité antivirale. Pour cela, des efforts de recherche doivent porter sur les métabolites structurels des membranes hôtes et virales mais aussi sur les vésicules. En parallèle, étudier le cycle métabolique des algues permettra de comprendre les prérequis métaboliques de la cellule à l'infection. L'étude détaillée du paysage métabolique pendant l'infection virale, combinée à des données génomiques et protéomiques de l'hôte et du virus, permettra de discriminer les voies métaboliques codées par l'hôte de celles soutenues, créées, détournées par les gènes viraux. Finalement, comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent les interactions hôte-virus à l'échelle individuelle aidera à la compréhension du fonctionnement des systèmes à plus grande échelle comme l'organisation, la coévolution et la succession des communautés biologiques ou encore le déroulement des cycles biogéochimiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abergel, C., Legendre, M., and Claverie, J.-M. (2015). The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. *FEMS Microbiology Reviews* 39, 779–796.
- Abida, H., Dolch, L.-J., Mei, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M.A., Finazzi, G., Bastien, O., Tirichine, L., Bowler, C., et al. (2015). Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology* 167, 118–136.
- Abu-Omar, M.M., Loaiza, A., and Hontzeas, N. (2005). Reaction Mechanisms of Mononuclear Non-Heme Iron Oxygenases. *Chemical Reviews* 105, 2227–2252.
- Afendi, F.M., Okada, T., Yamazaki, M., Hirai-Morita, A., Nakamura, Y., Nakamura, K., Ikeda, S., Takahashi, H., Altaf-Ul-Amin, M., Darusman, L.K., et al. (2012). KNApSAcK family databases: integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol.* 53, e1.
- Aguilera-Romero, A., Gehin, C., and Riezman, H. (2014). Sphingolipid homeostasis in the web of metabolic routes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841, 647–656.
- Ahmann, K., Heilmann, M., and Feussner, I. (2011). Identification of a $\Delta 4$ -desaturase from the microalga *Ostreococcus lucimarinus*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 832–840.
- Alseekh, S., and Fernie, A.R. (2018). Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? *The Plant Journal* 94, 933–942.
- Altan-Bonnet, N. (2016). Extracellular vesicles are the Trojan horses of viral infection. *Current Opinion in Microbiology* 32, 77–81.
- Ameisen, J.C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death & Differentiation* 9, 367–393.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnström, Å., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Göbel, C., Feussner, I., and Ellerström, M. (2006). Oxylipin Profiling of the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana*: FORMATION OF A NOVEL OXO-PHYTODIENOIC ACID-CONTAINING GALACTOLIPID, ARABIDOPSIDE E. *Journal of Biological Chemistry* 281, 31528–31537.
- Andreou, A., Brodhun, F., and Feussner, I. (2009). Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Progress in Lipid Research* 48, 148–170.
- Arantes, T.S., Rodrigues, R.A.L., dos Santos Silva, L.K., Oliveira, G.P., de Souza, H.L., Khalil, J.Y.B., de Oliveira, D.B., Torres, A.A., da Silva, L.L., Colson, P., et al. (2016). The Large Marseillevirus Explores Different Entry Pathways by Forming Giant Infectious Vesicles. *Journal of Virology* 90, 5246–5255.
- Arif, M., Bai, Y., Usman, M., Jalalah, M., Harraz, F.A., Al-Assiri, M.S., Li, X., Salama, E.-S., and Zhang, C. (2020). Highest accumulated microalgal lipids (polar and non-polar) for biodiesel production with advanced wastewater treatment: Role of lipidomics. *Bioresource Technology* 298, 122299.
- Armada, I., Hachero-Cruzado, I., Mazuelos, N., Ríos, J.L., Manchado, M., and Cañavate, J.P. (2013). Differences in betaine lipids and fatty acids between *Pseudoisochrysis paradoxa* VLP and *Diacronema vlkianum* VLP isolates (Haptophyta). *Phytochemistry* 95, 224–233.

- de Armas-Rillo, L., Valera, M.-S., Marrero-Hernández, S., and Valenzuela-Fernández, A. (2016). Membrane dynamics associated with viral infection: Viruses and cell membranes. *Reviews in Medical Virology* 26, 146–160.
- Arnold, M.D., Gruber, C., Floková, K., Miersch, O., Strnad, M., Novák, O., Wasternack, C., and Hause, B. (2016). The Recently Identified Isoleucine Conjugate of cis-12-Oxo-Phytodienoic Acid Is Partially Active in cis-12-Oxo-Phytodienoic Acid-Specific Gene Expression of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* 11, e0162829.
- Awai, K., Marechal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K. -i., Ohta, H., and Joyard, J. (2001). Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 10960–10965.
- Aye, I.L.M.H., Waddell, B.J., Mark, P.J., and Keelan, J.A. (2012). Oxysterols exert proinflammatory effects in placental trophoblasts via TLR4-dependent, cholesterol-sensitive activation of NF- κ B. *Molecular Human Reproduction* 18, 341–353.
- Azam, F. (1998). OCEANOGRAPHY: Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens. *Science* 280, 694–696.
- Babenko, L.M., M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Skaterna, T.D., Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Kosakivska, I.V., and M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv (2017). Lipoxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. *The Ukrainian Biochemical Journal* 89, 5–21.
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S., and Werck-Reichhart, D. (2011). Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* 9, e0144.
- Banerjee, A., and Sharkey, T.D. (2014). Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Nat. Prod. Rep.* 31, 1043–1055.
- Baranowski, E. (2001). Evolution of Cell Recognition by Viruses. *Science* 292, 1102–1105.
- Bar-On, Y.M., Phillips, R., and Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 6506–6511.
- Baudoux, A.-C., Lebretonchel, H., Dehmer, H., Latimier, M., Edern, R., Rigaut-Jalabert, F., Ge, P., Guillou, L., Foulon, E., Bozec, Y., et al. (2015). Interplay between the genetic clades of *Micromonas* and their viruses in the Western English Channel: *Micromonas* -virus interactions. *Environmental Microbiology Reports* 7, 765–773.
- BeGora, M.D., Macleod, M.J.R., McCarry, B.E., Summers, P.S., and Weretilnyk, E.A. (2010). Identification of Phosphomethylethanolamine *N*-Methyltransferase from *Arabidopsis* and Its Role in Choline and Phospholipid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 285, 29147–29155.
- Behrenfeld, M.J. (2001). Biospheric Primary Production During an ENSO Transition. *Science* 291, 2594–2597.
- Bellec, L., and Desdevises, Y. (2015). Quand virus et hôtes évoluent ensemble : la fidélité est-elle la règle ? *Virologie* 19, 140–148.
- Berardini, T.Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., and Huala, E. (2015). The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome: Tair: Making and Mining the “Gold Standard” Plant Genome. *Genesis* 53, 474–485.

- Bergh, Ø., Børshheim, K.Y., Bratbak, G., and Haldal, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* *340*, 467–468.
- Beste, L., Nahar, N., Dalman, K., Fujioka, S., Jonsson, L., Dutta, P.C., and Sitbon, F. (2011). Synthesis of Hydroxylated Sterols in Transgenic Arabidopsis Plants Alters Growth and Steroid Metabolism. *Plant Physiology* *157*, 426–440.
- Bi, F.-C., Liu, Z., Wu, J.-X., Liang, H., Xi, X.-L., Fang, C., Sun, T.-J., Yin, J., Dai, G.-Y., Rong, C., et al. (2014). Loss of Ceramide Kinase in *Arabidopsis* Impairs Defenses and Promotes Ceramide Accumulation and Mitochondrial H₂O₂ Bursts. *The Plant Cell* *26*, 3449–3467.
- Bidle, K.D. (2016). Programmed Cell Death in Unicellular Phytoplankton. *Current Biology* *26*, R594–R607.
- Bidle, K.D., and Falkowski, P.G. (2004). Cell death in planktonic, photosynthetic microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* *2*, 643–655.
- Bidle, K.D., Haramaty, L., Barcelos e Ramos, J., and Falkowski, P. (2007). Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 6049–6054.
- Bieberich, E. (2018). Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of analysis. *Chemistry and Physics of Lipids* *216*, 114–131.
- Biller, S.J., Schubotz, F., Roggensack, S.E., Thompson, A.W., Summons, R.E., and Chisholm, S.W. (2014). Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems. *Science* *343*, 183–186.
- Bishop, G.J., and Yokota, T. (2001). Plants Steroid Hormones, Brassinosteroids: Current Highlights of Molecular Aspects on their Synthesis/Metabolism, Transport, Perception and Response. *Plant and Cell Physiology* *42*, 114–120.
- Blackham, S., Baillie, A., Al-Hababi, F., Remlinger, K., You, S., Hamatake, R., and McGarvey, M.J. (2010). Gene Expression Profiling Indicates the Roles of Host Oxidative Stress, Apoptosis, Lipid Metabolism, and Intracellular Transport Genes in the Replication of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* *84*, 5404–5414.
- Blanc, M., Hsieh, W.Y., Robertson, K.A., Watterson, S., Shui, G., Lacaze, P., Khondoker, M., Dickinson, P., Sing, G., Rodríguez-Martín, S., et al. (2011). Host Defense against Viral Infection Involves Interferon Mediated Down-Regulation of Sterol Biosynthesis. *PLoS Biology* *9*, e1000598.
- Blanc-Mathieu, R., Krasovec, M., Hebrard, M., Yau, S., Desgranges, E., Martin, J., Schackwitz, W., Kuo, A., Salin, G., Donnadieu, C., et al. (2017). Population genomics of picophytoplankton unveils novel chromosome hypervariability. *Science Advances* *3*, e1700239.
- Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* *7*, 315–322.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* *37*, 911–917.
- Borner, G.H.H., Sherrier, D.J., Weimar, T., Michaelson, L.V., Hawkins, N.D., MacAskill, A., Napier, J.A., Beale, M.H., Lilley, K.S., and Dupree, P. (2005). Analysis of Detergent-Resistant Membranes in Arabidopsis. Evidence for Plasma Membrane Lipid Rafts. *Plant Physiology* *137*, 104–116.
- Böttcher, C., and Weiler, E.W. (2007). cyclo-Oxylipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics. *Planta* *226*, 629–637.

- Boudière, L., Michaud, M., Petroustos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J., et al. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 470–480.
- Bouwmeester, H.J., Matusova, R., Zhongkui, S., and Beale, M.H. (2003). Secondary metabolite signalling in host–parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 358–364.
- Boyd, P., and Newton, P. (1995). Evidence of the potential influence of planktonic community structure on the interannual variability of particulate organic carbon flux. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 42, 619–639.
- Brash, A.R. (1999). Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *Journal of Biological Chemistry* 274, 23679–23682.
- Bratbak, G., Levasseur, M., Michaud, S., Cantin, G., Fernández, E., Heimdal, B., and Heldal, M. (1995). Viral activity in relation to *Emiliana huxleyi* blooms: a mechanism of DMSP release? *Marine Ecology Progress Series* 128, 133–142.
- Breitbart, M. (2012). Marine Viruses: Truth or Dare. *Annual Review of Marine Science* 4, 425–448.
- Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F.T., and Krausslich, H.-G. (2006). The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 2641–2646.
- Brussaard, C.P.D. (2004). Viral Control of Phytoplankton Populations—a Review. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 51, 125–138.
- Brzeska, M., Szymczyk, K., and Szterk, A. (2016). Current Knowledge about Oxysterols: A Review: Current knowledge about oxysterols.... *Journal of Food Science* 81, R2299–R2308.
- Buick, R. (2008). When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 2731–2743.
- Bukrinsky, M.I., Mukhamedova, N., and Sviridov, D. (2020). Lipid rafts and pathogens: the art of deception and exploitation. *Journal of Lipid Research* 61, 601–610.
- Burki, F., Roger, A.J., Brown, M.W., and Simpson, A.G.B. (2020). The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution* 35, 43–55.
- Buseman, C.M., Tamura, P., Sparks, A.A., Baughman, E.J., Maatta, S., Zhao, J., Roth, M.R., Esch, S.W., Shah, J., Williams, T.D., et al. (2006). Wounding Stimulates the Accumulation of Glycerolipids Containing Oxophytodienoic Acid and Dinor-Oxophytodienoic Acid in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiology* 142, 28–39.
- Cacas, J.-L., Furt, F., Le Guédard, M., Schmitter, J.-M., Buré, C., Gerbeau-Pissot, P., Moreau, P., Bessoule, J.-J., Simon-Plas, F., and Mongrand, S. (2012). Lipids of plant membrane rafts. *Progress in Lipid Research* 51, 272–299.
- del Campo, J., Sieracki, M.E., Molestina, R., Keeling, P., Massana, R., and Ruiz-Trillo, I. (2014). The others: our biased perspective of eukaryotic genomes. *Trends in Ecology & Evolution* 29, 252–259.
- Cañavate, J.P., Armada, I., Ríos, J.L., and Hachero-Cruzado, I. (2016). Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* 124, 68–78.

- Canfield, D.E., Rosing, M.T., and Bjerrum, C. (2006). Early anaerobic metabolisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 1819–1836.
- Capy, P., Gasperi, G., Biéumont, C., and Bazin, C. (2000). Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity* 85, 101–106.
- Charlson, R.J., Lovelock, J.E., Andreae, M.O., and Warren, S.G. (1987). Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* 326, 655–661.
- Chazal, N., and Gerlier, D. (2003). Virus Entry, Assembly, Budding, and Membrane Rafts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 226–237.
- Chechetkin, I.R., Mukhitova, F.K., Blufard, A.S., Yarin, A.Y., Antsygina, L.L., and Grechkin, A.N. (2009). Unprecedented pathogen-inducible complex oxylipins from flax - linolipins A and B. *FEBS Journal* 276, 4463–4472.
- Chechetkin, I.R., Blufard, A.S., Khairutdinov, B.I., Mukhitova, F.K., Gorina, S.S., Yarin, A.Y., Antsygina, L.L., and Grechkin, A.N. (2013). Isolation and structure elucidation of linolipins C and D, complex oxylipins from flax leaves. *Phytochemistry* 96, 110–116.
- Chen, D., Yuan, X., Liang, L., Liu, K., Ye, H., Liu, Z., Liu, Y., Huang, L., He, W., Chen, Y., et al. (2019). Overexpression of acetyl-CoA carboxylase increases fatty acid production in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Letters* 41, 1133–1145.
- Chen, K., Ríos, J.J., Pérez-Gálvez, A., and Roca, M. (2015). Development of an accurate and high-throughput methodology for structural comprehension of chlorophylls derivatives. (I) Phytylated derivatives. *Journal of Chromatography A* 1406, 99–108.
- Chen, M., Han, G., Dietrich, C.R., Dunn, T.M., and Cahoon, E.B. (2006). The Essential Nature of Sphingolipids in Plants as Revealed by the Functional Identification and Characterization of the *Arabidopsis* LCB1 Subunit of Serine Palmitoyltransferase. *The Plant Cell* 18, 3576–3593.
- Chen, M., Markham, J.E., Dietrich, C.R., Jaworski, J.G., and Cahoon, E.B. (2008). Sphingolipid Long-Chain Base Hydroxylation Is Important for Growth and Regulation of Sphingolipid Content and Composition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 1862–1878.
- Chen, X., Snyder, C.L., Truksa, M., Shah, S., and Weselake, R.J. (2011a). *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1695–1699.
- Chen, X.-L., Shi, T., Yang, J., Shi, W., Gao, X., Chen, D., Xu, X., Xu, J.-R., Talbot, N.J., and Peng, Y.-L. (2014). *N*-Glycosylation of Effector Proteins by an α -1,3-Mannosyltransferase Is Required for the Rice Blast Fungus to Evade Host Innate Immunity. *The Plant Cell* 26, 1360–1376.
- Chen, Y., Kelly, E.E., Masluk, R.P., Nelson, C.L., Cantu, D.C., and Reilly, P.J. (2011b). Structural classification and properties of ketoacyl synthases. *Protein Science* 20, 1659–1667.
- Chiantia, S., Kahya, N., and Schwille, P. (2007). Raft Domain Reorganization Driven by Short- and Long-Chain Ceramide: A Combined AFM and FCS Study. *Langmuir* 23, 7659–7665.
- Chilton, F., Murphy, R., Wilson, B., Sergeant, S., Ainsworth, H., Seeds, M., and Mathias, R. (2014). Diet-Gene Interactions and PUFA Metabolism: A Potential Contributor to Health Disparities and Human Diseases. *Nutrients* 6, 1993–2022.
- Choi, Y.H., Lee, J.K., Lee, C.-H., and Cho, S.H. (2000). cDNA Cloning and Expression of an Aminoalcoholphosphotransferase Isoform in Chinese Cabbage. *Plant and Cell Physiology* 41, 1080–1084.

- Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czaplá, H., Tanner, L.B., Narayanaswamy, P., Wenk, M.R., Nakatsu, F., and De Camilli, P. (2015). PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* 349, 428–432.
- Clerissi, C., Desdevises, Y., and Grimsley, N. (2012). Prasinoviruses of the Marine Green Alga *Ostreococcus tauri* Are Mainly Species Specific. *Journal of Virology* 86, 4611–4619.
- Collino, S., Martin, F.-P.J., and Rezzi, S. (2013). Clinical metabolomics paves the way towards future healthcare strategies: Clinical metabolomics. *British Journal of Clinical Pharmacology* 75, 619–629.
- da Costa, E., Silva, J., Mendonça, S., Abreu, M., and Domingues, M. (2016). Lipidomic Approaches towards Deciphering Glycolipids from Microalgae as a Reservoir of Bioactive Lipids. *Marine Drugs* 14, 101.
- da Costa, E., Domingues, P., Melo, T., Coelho, E., Pereira, R., Calado, R., Abreu, M.H., and Domingues, M.R. (2019). Lipidomic Signatures Reveal Seasonal Shifts on the Relative Abundance of High-Valued Lipids from the Brown Algae *Fucus vesiculosus*. *Marine Drugs* 17, 335.
- Countway, P.D., and Caron, D.A. (2006). Abundance and Distribution of *Ostreococcus* sp. in the San Pedro Channel, California, as Revealed by Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2496–2506.
- Courties, C., Vaquer, A., Troussellier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, M.J., Neveux, J., Machado, C., and Claustre, H. (1994). Smallest eukaryotic organism. *Nature* 370, 255–255.
- Coyne, C.B., and Bergelson, J.M. (2006). Virus-Induced Abl and Fyn Kinase Signals Permit Cocksackievirus Entry through Epithelial Tight Junctions. *Cell* 124, 119–131.
- Crown, S.B., Marze, N., and Antoniewicz, M.R. (2015). Catabolism of Branched Chain Amino Acids Contributes Significantly to Synthesis of Odd-Chain and Even-Chain Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes. *PLOS ONE* 10, e0145850.
- D'Angelo, G., Capasso, S., Sticco, L., and Russo, D. (2013). Glycosphingolipids: synthesis and functions. *FEBS Journal* 280, 6338–6353.
- Darnet, S., and Schaller, H. (2019). Metabolism and Biological Activities of 4-Methyl-Sterols. *Molecules* 24, 451.
- Dave, A., and Graham, I.A. (2012). Oxylipin Signaling: A Distinct Role for the Jasmonic Acid Precursor cis-(+)-12-Oxo-Phytodienoic Acid (cis-OPDA). *Frontiers in Plant Science* 3.
- Davoine, C., Abreu, I.N., Khajeh, K., Blomberg, J., Kidd, B.N., Kazan, K., Schenk, P.M., Gerber, L., Nilsson, O., Moritz, T., et al. (2017). Functional metabolomics as a tool to analyze Mediator function and structure in plants. *PLOS ONE* 12, e0179640.
- De Bigault Du Granrut, A., and Cacas, J.-L. (2016). How Very-Long-Chain Fatty Acids Could Signal Stressful Conditions in Plants? *Frontiers in Plant Science* 7.
- DeAngelis, P.L., Jing, W., Graves, M.V., Burbank, D.E., and Van Etten, J.L. (1997). Hyaluronan Synthase of *Chlorella* Virus PBCV-1. *Science* 278, 1800–1803.
- Degraeve-Guilbault, C., Bréhélin, C., Haslam, R., Sayanova, O., Marie-Luce, G., Jouhet, J., and Corellou, F. (2017). Glycerolipid Characterization and Nutrient Deprivation-Associated Changes in the Green Picoalga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiology* 173, 2060–2080.

- Degraeve-Guilbault, C., Gomez, R.E., Lemoigne, C., Pankanssem, N., Morin, S., Tuphile, K., Joubes, J., Jouhet, J., Gronnier, J., Suzuki, I., et al. (2020). Plastidic Δ^6 Fatty-Acid Desaturases with Distinctive Substrate Specificity Regulate the Pool of C18-PUFAS in the Ancestral Picoalga *Ostreococcus Tauri*. *Plant Physiology* pp.00281.2020.
- Delgado, T., Sanchez, E.L., Camarda, R., and Lagunoff, M. (2012). Global Metabolic Profiling of Infection by an Oncogenic Virus: KSHV Induces and Requires Lipogenesis for Survival of Latent Infection. *PLoS Pathogens* 8, e1002866.
- Delhaize, E., Hebb, D.M., Richards, K.D., Lin, J.-M., Ryan, P.R., and Gardner, R.C. (1999). Cloning and Expression of a Wheat (*Triticum aestivum* L.) Phosphatidylserine Synthase cDNA: OVEREXPRESSION IN PLANTS ALTERS THE COMPOSITION OF PHOSPHOLIPIDS. *Journal of Biological Chemistry* 274, 7082–7088.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouze, P., Worden, A.Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynie, S., Cooke, R., et al. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 11647–11652.
- Derelle, E., Ferraz, C., Escande, M.-L., Eychenié, S., Cooke, R., Piganeau, G., Desdevises, Y., Bellec, L., Moreau, H., and Grimsley, N. (2008). Life-Cycle and Genome of OtV5, a Large DNA Virus of the Pelagic Marine Unicellular Green Alga *Ostreococcus tauri*. *PLoS ONE* 3, e2250.
- Derelle, E., Yau, S., Moreau, H., and Grimsley, N.H. (2018). Prasinovirus Attack of *Ostreococcus* Is Furtive by Day but Savage by Night. *Journal of Virology* JVI.01703-17.
- Devarenne, T.P., Ghosh, A., and Chappell, J. (2002). Regulation of Squalene Synthase, a Key Enzyme of Sterol Biosynthesis, in Tobacco. *Plant Physiology* 129, 1095–1106.
- Dhar, M.K., Koul, A., and Kaul, S. (2013). Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. *New Biotechnology* 30, 114–123.
- Diener, A.C., Li, H., Zhou, W., Whoriskey, W.J., Nes, W.D., and Fink, G.R. (2000). *STEROL METHYLTRANSFERASE 1* Controls the Level of Cholesterol in Plants. *The Plant Cell* 12, 853–870.
- Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P.G., Boland, W., Zähringer, U., and Heinz, E. (2003). New Insight into *Phaeodactylum tricornutum* Fatty Acid Metabolism. Cloning and Functional Characterization of Plastidial and Microsomal Δ^{12} -Fatty Acid Desaturases. *Plant Physiology* 131, 1648–1660.
- Domergue, F., Abbadì, A., Zähringer, U., Moreau, H., and Heinz, E. (2005). *In vivo* characterization of the first acyl-CoA Δ^6 -desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *Biochemical Journal* 389, 483–490.
- Dowd, M.K. (2012). Identification of the Unsaturated Heptadecyl Fatty Acids in the Seed Oils of *Thespesia populnea* and *Gossypium hirsutum*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89, 1599–1609.
- Drews, K., Calgi, M.P., Harrison, W.C., Drews, C.M., Costa-Pinheiro, P., Shaw, J.J.P., Jobe, K.A., Han, J.D., Fox, T.E., White, J.M., et al. (2020). Glucosylceramide synthase maintains influenza virus entry and infection. *PLOS ONE* 15, e0228735.
- Duan, H., Huang, M.-Y., Palacio, K., and Schuler, M.A. (2005). Variations in *CYP74B2* (Hydroperoxide Lyase) Gene Expression Differentially Affect Hexenal Signaling in the Columbia and Landsberg *erecta* Ecotypes of Arabidopsis. *Plant Physiology* 139, 1529–1544.

- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., and Böcker, S. (2015). Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, 12580–12585.
- Dunahay, T.G., Jarvis, E.E., Dais, S.S., and Roessler, P.G. (1996). Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology* *57–58*, 223–231.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., and Barrett, S.M. (1992). Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* *161*, 115–134.
- Durand, P.M., Rashidi, A., and Michod, R.E. (2011). How an Organism Dies Affects the Fitness of Its Neighbors. *The American Naturalist* *177*, 224–232.
- Eastmond, P.J., Quettier, A.-L., Kroon, J.T.M., Craddock, C., Adams, N., and Slabas, A.R. (2010). PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHOHYDROLASE1 and 2 Regulate Phospholipid Synthesis at the Endoplasmic Reticulum in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* *22*, 2796–2811.
- Enav, H., Mandel-Gutfreund, Y., and Béjà, O. (2014). Comparative metagenomic analyses reveal viral-induced shifts of host metabolism towards nucleotide biosynthesis. *Microbiome* *2*, 9.
- Essigmann, B., Guler, S., Narang, R.A., Linke, D., and Benning, C. (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 1950–1955.
- Evans, C., Malin, G., Mills, G.P., and Wilson, W.H. (2006). VIRAL INFECTION OF EMILIANIA HUXLEYI (PRYMNESIOPHYCEAE) LEADS TO ELEVATED PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES. *Journal of Phycology* *42*, 1040–1047.
- Evans, C., Pond, D., and Wilson, W. (2009). Changes in *Emiliana huxleyi* fatty acid profiles during infection with *E. huxleyi* virus 86: physiological and ecological implications. *Aquatic Microbial Ecology* *55*, 219–228.
- Fan, J., Andre, C., and Xu, C. (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* *585*, 1985–1991.
- Farinas, B., Mary, C., de O Manes, C.-L., Bhaud, Y., Peaucellier, G., and Moreau, H. (2006). Natural Synchronisation for the Study of Cell Division in the Green Unicellular Alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Molecular Biology* *60*, 277–292.
- Feussner, I., Wasternack, C., Kindl, H., and Kuhn, H. (1995). Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *92*, 11849–11853.
- Field, C.B. (1998). Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* *281*, 237–240.
- Figueiredo, A., Martins, J., Sebastiana, M., Guerreiro, A., Silva, A., Matos, A.R., Monteiro, F., Pais, M.S., Roepstorff, P., and Coelho, A.V. (2017). Specific adjustments in grapevine leaf proteome discriminating resistant and susceptible grapevine genotypes to *Plasmopara viticola*. *Journal of Proteomics* *152*, 48–57.
- Floková, K., Feussner, K., Herrfurth, C., Miersch, O., Mik, V., Tarkowská, D., Strnad, M., Feussner, I., Wasternack, C., and Novák, O. (2016). A previously undescribed jasmonate compound in flowering *Arabidopsis thaliana* – The identification of cis-(+)-OPDA-Ile. *Phytochemistry* *122*, 230–237.

- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Forterre, P. (2013). The virocell concept and environmental microbiology. *The ISME Journal* 7, 233–236.
- Foss, P., Guillard, R.R.L., and Liaaen-Jensen, S. (1984). Prasinolanthin—a chemosystematic marker for algae. *Phytochemistry* 23, 1629–1633.
- Fray, R.G., Wallace, A., Fraser, P.D., Valero, D., Hedden, P., Bramley, P.M., and Grierson, D. (1995). Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal* 8, 693–701.
- Frentzen, M., Heinz, E., McKEON, T.A., and Stumpf, P.K. (1983). Specificities and Selectivities of Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase and Monoacylglycerol-3-Phosphate Acyltransferase from Pea and Spinach Chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* 129, 629–636.
- Fuhrman, J.A. (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399, 541–548.
- Fulton, J.M., Fredricks, H.F., Bidle, K.D., Vardi, A., Kendrick, B.J., DiTullio, G.R., and Van Mooy, B.A.S. (2014). Novel molecular determinants of viral susceptibility and resistance in the lipidome of *Emiliana huxleyi*: Novel lipids in *Emiliana huxleyi*. *Environmental Microbiology* 16, 1137–1149.
- Gagné, S.J., Reed, D.W., Gray, G.R., and Covello, P.S. (2009). Structural Control of Chemoselectivity, Stereoselectivity, and Substrate Specificity in Membrane-Bound Fatty Acid Acetylases and Desaturases. *Biochemistry* 48, 12298–12304.
- Gajate, C., and Mollinedo, F. (2020). Lipid Raft Isolation by Sucrose Gradient Centrifugation and Visualization of Raft-Located Proteins by Fluorescence Microscopy: The Use of Combined Techniques to Assess Fas/CD95 Location in Rafts During Apoptosis Triggering. In *Lipid Rafts*, E. Bieberich, ed. (New York, NY: Springer US), pp. 147–186.
- Genva, M., Obounou Akong, F., Andersson, M.X., Deleu, M., Lins, L., and Fauconnier, M.-L. (2019). New insights into the biosynthesis of esterified oxylipins and their involvement in plant defense and developmental mechanisms. *Phytochemistry Reviews* 18, 343–358.
- Gidwani, A. (2003). Disruption of lipid order by short-chain ceramides correlates with inhibition of phospholipase D and downstream signaling by Fc RI. *Journal of Cell Science* 116, 3177–3187.
- Gilbert, C., Peccoud, J., Chateigner, A., Moumen, B., Cordaux, R., and Herniou, E.A. (2016). Continuous Influx of Genetic Material from Host to Virus Populations. *PLOS Genetics* 12, e1005838.
- Gill, S., Catchpole, R., and Forterre, P. (2019). Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiology Reviews* 43, 273–303.
- Gong, Z., Liang, Y., Wang, M., Jiang, Y., Yang, Q., Xia, J., Zhou, X., You, S., Gao, C., Wang, J., et al. (2018). Viral Diversity and Its Relationship With Environmental Factors at the Surface and Deep Sea of Prydz Bay, Antarctica. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Gostinčar, C., Turk, M., and Gunde-Cimerman, N. (2010). The Evolution of Fatty Acid Desaturases and Cytochrome b5 in Eukaryotes. *Journal of Membrane Biology* 233, 63–72.
- Greenberg, J.T., Silverman, F.P., and Liang, H. (2000). Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the Arabidopsis mutant *acd5*. *Genetics* 156, 341–350.

- Gregory, A.C., Zayed, A.A., Conceição-Neto, N., Temperton, B., Bolduc, B., Alberti, A., Ardyna, M., Arkhipova, K., Carmichael, M., Cruaud, C., et al. (2019). Marine DNA Viral Macro- and Microdiversity from Pole to Pole. *Cell* 177, 1109-1123.e14.
- Griebel, T., and Zeier, J. (2010). A role for β -sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions: Stigmasterol promotes plant susceptibility. *The Plant Journal* 63, 254–268.
- Griffiths, G. (2015). Biosynthesis and analysis of plant oxylipins. *Free Radical Research* 49, 565–582.
- Grimsley, N., Yau, S., Piganeau, G., and Moreau, H. (2015). Typical Features of Genomes in the Mamiellophyceae. In *Marine Protists*, S. Ohtsuka, T. Suzaki, T. Horiguchi, N. Suzuki, and F. Not, eds. (Tokyo: Springer Japan), pp. 107–127.
- Gronnier, J., Germain, V., Gouguet, P., Cacas, J.-L., and Mongrand, S. (2016). GIPC: Glycosyl Inositol Phospho Ceramides, the major sphingolipids on earth. *Plant Signaling & Behavior* 11, e1152438.
- Gross, J., and Bhattacharya, D. (2010). Uniting sex and eukaryote origins in an emerging oxygenic world. *Biology Direct* 5, 53.
- Guella, G., Frassanito, R., and Mancini, I. (2003). A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17, 1982–1994.
- Guschina, I.A., and Harwood, J.L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45, 160–186.
- Guschina, I.A., and Harwood, J.L. (2009). Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In *Lipids in Aquatic Ecosystems*, M. Kainz, M.T. Brett, and M.T. Arts, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 1–24.
- Guschina, I.A., Everard, J.D., Kinney, A.J., Quant, P.A., and Harwood, J.L. (2014). Studies on the regulation of lipid biosynthesis in plants: application of control analysis to soybean. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 1488–1500.
- Häder, D.-P., Villafañe, V.E., and Helbling, E.W. (2014). Productivity of aquatic primary producers under global climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 13, 1370–1392.
- Hagio, M., Gombos, Z., Várkonyi, Z., Masamoto, K., Sato, N., Tsuzuki, M., and Wada, H. (2000). Direct Evidence for Requirement of Phosphatidylglycerol in Photosystem II of Photosynthesis. *Plant Physiology* 124, 795–804.
- Hamberg, M., Sanz, A., Rodriguez, M.J., Calvo, A.P., and Castresana, C. (2003). Activation of the Fatty Acid α -Dioxygenase Pathway during Bacterial Infection of Tobacco Leaves: FORMATION OF OXYLIPINS PROTECTING AGAINST CELL DEATH. *Journal of Biological Chemistry* 278, 51796–51805.
- Hamilton, W.D. (1964). The genetical evolution of social behaviour. I. *Journal of Theoretical Biology* 7, 1–16.
- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G.B., and Roger, A.J. (2009). Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 3859–3864.
- Hanada, K. (2005). Sphingolipids in infectious diseases. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58, 131–148.

- Hartmann, M. (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science* 3, 170–175.
- Harwood, J.L. (2019). Algae: Critical Sources of Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Biomolecules* 9, 708.
- Hazen, S.L. (2008). Oxidized Phospholipids as Endogenous Pattern Recognition Ligands in Innate Immunity. *Journal of Biological Chemistry* 283, 15527–15531.
- Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44, 321–334.
- Heath, S., Knox, K., Vale, P., and Collins, S. (2017). Virus Resistance Is Not Costly in a Marine Alga Evolving under Multiple Environmental Stressors. *Viruses* 9, 39.
- Heftmann, E. (1971). Functions of sterols in plants. *Lipids* 6, 128–133.
- Heilmann, I. (2016). Phosphoinositide signaling in plant development. *Development* 143, 2044–2055.
- Helliwell, C.A., Sheldon, C.C., Olive, M.R., Walker, A.R., Zeevaert, J.A.D., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (1998). Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 9019–9024.
- Henderson, G.P., Gan, L., and Jensen, G.J. (2007). 3-D Ultrastructure of *O. tauri*: Electron Cryotomography of an Entire Eukaryotic Cell. *PLoS ONE* 2, e749.
- Henquet, M., Lehle, L., Schreuder, M., Rouwendal, G., Molthoff, J., Helsper, J., van der Krol, S., and Bosch, D. (2008). Identification of the Gene Encoding the α 1,3-Mannosyltransferase (ALG3) in *Arabidopsis* and Characterization of Downstream *N*-Glycan Processing. *The Plant Cell* 20, 1652–1664.
- Hirth, M., Liverani, S., Mahlow, S., Bouget, F.-Y., Pohnert, G., and Sasso, S. (2017). Metabolic profiling identifies trehalose as an abundant and diurnally fluctuating metabolite in the microalga *Ostreococcus tauri*. *Metabolomics* 13.
- Hisamatsu, Y., Goto, N., Hasegawa, K., and Shigemori, H. (2003). Arabidopsides A and B, two new oxylipins from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Letters* 44, 5553–5556.
- Hisamatsu, Y., Goto, N., Sekiguchi, M., Hasegawa, K., and Shigemori, H. (2005). Oxylipins Arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Natural Products* 68, 600–603.
- Hodzic, A., Rappolt, M., Amenitsch, H., Laggnier, P., and Pabst, G. (2008). Differential Modulation of Membrane Structure and Fluctuations by Plant Sterols and Cholesterol. *Biophysical Journal* 94, 3935–3944.
- Hofmann, M., and Eichenberger, W. (1996). Biosynthesis of diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence for lipid-linked N methylation. *Journal of Bacteriology* 178, 6140–6144.
- Holland, H.D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 903–915.
- Holowka, D., Thanapuasawan, K., and Baird, B. (2018). Short chain ceramides disrupt immunoreceptor signaling by inhibiting segregation of Lo from Ld Plasma membrane components. *Biology Open* 7, bio034702.
- Hölzl, G., and Dörmann, P. (2019). Chloroplast Lipids and Their Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 70, 51–81.

- Hou, Q., Ufer, G., and Bartels, D. (2016). Lipid signalling in plant responses to abiotic stress: Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* 39, 1029–1048.
- Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., and Arad, S. (Malis) (2002). Activity of Porphyridium sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 50, 189–200.
- Hunter, J.E., Frada, M.J., Fredricks, H.F., Vardi, A., and Van Mooy, B.A.S. (2015). Targeted and untargeted lipidomics of *Emiliania huxleyi* viral infection and life cycle phases highlights molecular biomarkers of infection, susceptibility, and ploidy. *Frontiers in Marine Science* 2.
- Iyer, L.M., Balaji, S., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2006). Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Research* 117, 156–184.
- Jancek, S., Gourbiere, S., Moreau, H., and Piganeau, G. (2008). Clues about the Genetic Basis of Adaptation Emerge from Comparing the Proteomes of Two *Ostreococcus* Ecotypes (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Molecular Biology and Evolution* 25, 2293–2300.
- Jaramillo-Madrid, A.C., Ashworth, J., Fabris, M., and Ralph, P.J. (2020). The unique sterol biosynthesis pathway of three model diatoms consists of a conserved core and diversified endpoints. *Algal Research* 48, 101902.
- Jaworski, C.J., Moreira, E., Li, A., Lee, R., and Rodriguez, I.R. (2001). A Family of 12 Human Genes Containing Oxysterol-Binding Domains. *Genomics* 78, 185–196.
- Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J., and Block, M.A. (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *Journal of Cell Biology* 167, 863–874.
- Kalisch, B., Dörmann, P., and Hölzl, G. (2016). DGDG and Glycolipids in Plants and Algae. In *Lipids in Plant and Algae Development*, Y. Nakamura, and Y. Li-Beisson, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 51–83.
- Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science* 28, 1947–1951.
- Kang, B.S., Baek, J.H., Macoy, D.M., Chakraborty, R., Cha, J.-Y., Hwang, D.-J., Lee, Y.H., Lee, S.Y., Kim, W.-Y., and Kim, M.G. (2015). N-Glycosylation process in both ER and Golgi plays pivotal role in plant immunity. *Journal of Plant Biology* 58, 374–382.
- Karki, P., and Birukov, K.G. (2020). Oxidized Phospholipids in Healthy and Diseased Lung Endothelium. *Cells* 9, 981.
- Kato, M., Sakai, M., Adachi, K., Ikemoto, H., and Sano, H. (1996). Distribution of betaine lipids in marine algae. *Phytochemistry* 42, 1341–1345.
- Kato, M., Kobayashi, Y., Torii, A., and Yamada, M. (2003). Betaine Lipids in Marine Algae. In *Advanced Research on Plant Lipids*, N. Murata, M. Yamada, I. Nishida, H. Okuyama, J. Sekiya, and W. Hajime, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 19–22.
- Kausche, G.A., Pfankuch, E., and Ruska, H. (1939). Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Die Naturwissenschaften* 27, 292–299.
- Kay, J.G., and Fairn, G.D. (2019). Distribution, dynamics and functional roles of phosphatidylserine within the cell. *Cell Communication and Signaling* 17.

- Keeling, P.J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* *365*, 729–748.
- Keren-Shaul, H., Kenigsberg, E., Jaitin, D.A., David, E., Paul, F., Tanay, A., and Amit, I. (2019). MARS-seq2.0: an experimental and analytical pipeline for indexed sorting combined with single-cell RNA sequencing. *Nature Protocols* *14*, 1841–1862.
- Ketter, E., and Randall, G. (2019). Virus Impact on Lipids and Membranes. *Annual Review of Virology* *6*, 319–340.
- Khozin-Goldberg, I. (2016). Lipid Metabolism in Microalgae. In *The Physiology of Microalgae*, M.A. Borowitzka, J. Beardall, and J.A. Raven, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 413–484.
- Kielian, M.C., and Helenius, A. (1984). Role of cholesterol in fusion of Semliki Forest virus with membranes. *J. Virol.* *52*, 281–283.
- Kielian, M., Chatterjee, P.K., Gibbons, D.L., and Lu, Y.E. (2002). Specific Roles for Lipids in Virus Fusion and Exit Examples from the Alphaviruses. In *Fusion of Biological Membranes and Related Problems*, H. Hilderson, and S. Fuller, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 409–455.
- Kim, H.B., Lee, H., Oh, C.J., Lee, H.-Y., Eum, H.L., Kim, H.-S., Hong, Y.-P., Lee, Y., Choe, S., An, C.S., et al. (2010). Postembryonic Seedling Lethality in the Sterol-Deficient Arabidopsis *cyp51A2* Mutant Is Partially Mediated by the Composite Action of Ethylene and Reactive Oxygen Species. *Plant Physiology* *152*, 192–205.
- Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E.B., Nishida, I., and Lee, Y. (2013). AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 773–778.
- Klymchenko, A.S., and Kreder, R. (2014). Fluorescent Probes for Lipid Rafts: From Model Membranes to Living Cells. *Chemistry & Biology* *21*, 97–113.
- Kodner, R.B., Pearson, A., Summons, R.E., and Knoll, A.H. (2008). Sterols in red and green algae: quantification, phylogeny, and relevance for the interpretation of geologic steranes. *Geobiology* *6*, 411–420.
- Krasovec, M., Eyre-Walker, A., Sanchez-Ferandin, S., and Piganeau, G. (2017a). Spontaneous Mutation Rate in the Smallest Photosynthetic Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* *34*, 1770–1779.
- Krasovec, M., Eyre-Walker, A., Sanchez-Ferandin, S., and Piganeau, G. (2017b). Spontaneous Mutation Rate in the Smallest Photosynthetic Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* *34*, 1770–1779.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. Edited by F. Cohen. *Journal of Molecular Biology* *305*, 567–580.
- Ku, C., Sheyn, U., Seb -Pedr s, A., Ben-Dor, S., Schatz, D., Tanay, A., Rosenwasser, S., and Vardi, A. (2020). A single-cell view on alga-virus interactions reveals sequential transcriptional programs and infection states. *Science Advances* *6*, eaba4137.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology* *8*, 317–327.
- Laloi, M., Perret, A.-M., Chatre, L., Melsner, S., Cantrel, C., Vaultier, M.-N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J.-M., Vallet, M., et al. (2007). Insights into the Role of Specific Lipids in the Formation

and Delivery of Lipid Microdomains to the Plasma Membrane of Plant Cells. *Plant Physiology* *143*, 461–472.

Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., and Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology* *11*, 124.

Laureano, G., Figueiredo, J., Cavaco, A.R., Duarte, B., Caçador, I., Malhó, R., Sousa Silva, M., Matos, A.R., and Figueiredo, A. (2018). The interplay between membrane lipids and phospholipase A family members in grapevine resistance against *Plasmopara viticola*. *Scientific Reports* *8*.

Le Bihan, T., Martin, S.F., Chirnside, E.S., van Ooijen, G., Barrios-Llerena, M.E., O'Neill, J.S., Shliaha, P.V., Kerr, L.E., and Millar, A.J. (2011). Shotgun proteomic analysis of the unicellular alga *Ostreococcus tauri*. *Journal of Proteomics* *74*, 2060–2070.

Leblond, J.D., and Chapman, P.J. (2000). LIPID CLASS DISTRIBUTION OF HIGHLY UNSATURATED LONG CHAIN FATTY ACIDS IN MARINE DINOFLAGELLATES. *Journal of Phycology* *36*, 1103–1108.

Lecoq, H. (2001). Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac : 1892 ou 1898 ? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* *324*, 929–933.

Lee, A.G. (2000). Membrane lipids: It's only a phase. *Current Biology* *10*, R377–R380.

Lee, J.-Y., Cortese, M., Haselmann, U., Tabata, K., Romero-Brey, I., Funaya, C., Schieber, N.L., Qiang, Y., Bartenschlager, M., Kallis, S., et al. (2019). Spatiotemporal Coupling of the Hepatitis C Virus Replication Cycle by Creating a Lipid Droplet- Proximal Membranous Replication Compartment. *Cell Reports* *27*, 3602-3617.e5.

Lee, S.Y., Park, N.-H., Jeong, E.-K., Wi, J.-W., Kim, C.-J., Kim, J.Y., In, M.K., and Hong, J. (2012). Comparison of GC/MS and LC/MS methods for the analysis of propofol and its metabolites in urine. *Journal of Chromatography B* *900*, 1–10.

Leefmann, T., Heim, C., Kryvenda, A., Siljeström, S., Sjövall, P., and Thiel, V. (2013). Biomarker imaging of single diatom cells in a microbial mat using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Organic Geochemistry* *57*, 23–33.

Leliaert, F., Verbruggen, H., and Zechman, F.W. (2011). Into the deep: New discoveries at the base of the green plant phylogeny. *BioEssays* *33*, 683–692.

Lescot, M., Hingamp, P., Kojima, K.K., Villar, E., Romac, S., Veluchamy, A., Boccara, M., Jaillon, O., Iudicone, D., Bowler, C., et al. (2016). Reverse transcriptase genes are highly abundant and transcriptionally active in marine plankton assemblages. *The ISME Journal* *10*, 1134–1146.

Lewis, L.A., and McCourt, R.M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany* *91*, 1535–1556.

Li, D., Moorman, R., Vanhercke, T., Petrie, J., Singh, S., and Jackson, C.J. (2016). Classification and substrate head-group specificity of membrane fatty acid desaturases. *Computational and Structural Biotechnology Journal* *14*, 341–349.

Li, J., Zhao-Hui, C., Batoux, M., Nekrasov, V., Roux, M., Chinchilla, D., Zipfel, C., and Jones, J.D.G. (2009). Specific ER quality control components required for biogenesis of the plant innate immune receptor EFR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 15973–15978.

- Li, N., Gügel, I.L., Giavalisco, P., Zeisler, V., Schreiber, L., Soll, J., and Philippar, K. (2015). FAX1, a Novel Membrane Protein Mediating Plastid Fatty Acid Export. *PLOS Biology* 13, e1002053.
- Liavonchanka, A., and Feussner, I. (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* 163, 348–357.
- Li-Beisson, Y., Shorosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., Durrett, T.P., et al. (2010). Acyl-Lipid Metabolism. *The Arabidopsis Book* 8, e0133.
- Li-Beisson, Y., Beisson, F., and Riekhof, W. (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 82, 504–522.
- Li-Beisson, Y., Neunzig, J., Lee, Y., and Philippar, K. (2017). Plant membrane-protein mediated intracellular traffic of fatty acids and acyl lipids. *Current Opinion in Plant Biology* 40, 138–146.
- Lim, G.-H., Singhal, R., Kachroo, A., and Kachroo, P. (2017). Fatty Acid– and Lipid-Mediated Signaling in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* 55, 505–536.
- Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G., and Shanklin, J. (1996). Crystal structure of delta9 stearyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *The EMBO Journal* 15, 4081–4092.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J. (2007). Lipids in photosystem II: Interactions with protein and cofactors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767, 509–519.
- Lombard, J., and Moreira, D. (2011). Origins and Early Evolution of the Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in the Three Domains of Life. *Molecular Biology and Evolution* 28, 87–99.
- Lorizate, M., and Krausslich, H.-G. (2011). Role of Lipids in Virus Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a004820–a004820.
- Lu, Y.E., and Kielian, M. (2000). Semliki Forest Virus Budding: Assay, Mechanisms, and Cholesterol Requirement. *Journal of Virology* 74, 7708–7719.
- Lughadha, E.N., Govaerts, R., Belyaeva, I., Black, N., Lindon, H., Allkin, R., Magill, R.E., and Nicolson, N. (2016). Counting counts: revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a review of other recent estimates. *Phytotaxa* 272, 82.
- Luttgeharm, K.D., Chen, M., Mehra, A., Cahoon, R.E., Markham, J.E., and Cahoon, E.B. (2015). Overexpression of Arabidopsis Ceramide Synthases Differentially Affects Growth, Sphingolipid Metabolism, Programmed Cell Death, and Mycotoxin Resistance. *Plant Physiology* 169, 1108–1117.
- Lynch, D.V., and Dunn, T.M. (2004). An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function: Tansley review. *New Phytologist* 161, 677–702.
- Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., and Parton, R.G. (2007). Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response. *Cell Host & Microbe* 2, 229–239.
- Mackinder, L.C.M., Worthy, C.A., Biggi, G., Hall, M., Ryan, K.P., Varsani, A., Harper, G.M., Wilson, W.H., Brownlee, C., and Schroeder, D.C. (2009). A unicellular algal virus, *Emiliana huxleyi* virus 86, exploits an animal-like infection strategy. *Journal of General Virology* 90, 2306–2316.

- Maeda, Y., Terasawa, H., Tanaka, Y., Mitsuura, C., Nakashima, K., Yusa, K., and Harada, S. (2015). Separate Cellular Localizations of Human T-Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1) Env and Glucose Transporter Type 1 (GLUT1) Are Required for HTLV-1 Env-Mediated Fusion and Infection. *Journal of Virology* *89*, 502–511.
- Maginnis, M.S. (2018). Virus–Receptor Interactions: The Key to Cellular Invasion. *Journal of Molecular Biology* *430*, 2590–2611.
- Malitsky, S., Ziv, C., Rosenwasser, S., Zheng, S., Schatz, D., Porat, Z., Ben-Dor, S., Aharoni, A., and Vardi, A. (2016). Viral infection of the marine alga *Emiliania huxleyi* triggers lipidome remodeling and induces the production of highly saturated triacylglycerol. *New Phytologist* *210*, 88–96.
- Marat, A.L., Dokainish, H., and McPherson, P.S. (2011). DENN Domain Proteins: Regulators of Rab GTPases. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 13791–13800.
- Marcellin-Gros, R., Piganeau, G., and Stien, D. (2020). Metabolomic Insights into Marine Phytoplankton Diversity. *Mar Drugs* *18*.
- Marin, B., and Melkonian, M. (2010). Molecular Phylogeny and Classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on Sequence Comparisons of the Nuclear- and Plastid-encoded rRNA Operons. *Protist* *161*, 304–336.
- Markham, J.E., Li, J., Cahoon, E.B., and Jaworski, J.G. (2006). Separation and Identification of Major Plant Sphingolipid Classes from Leaves. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 22684–22694.
- Maruyama, F., and Ueki, S. (2016). Evolution and Phylogeny of Large DNA Viruses, Mimiviridae and Phycodnaviridae Including Newly Characterized Heterosigma akashiwo Virus. *Frontiers in Microbiology* *7*.
- Mashima, R., Okuyama, T., and Ohira, M. (2020). Biosynthesis of long chain base in sphingolipids in animals, plants and fungi. *Future Science OA* *6*, FSO434.
- Massana, R. (2011). Eukaryotic Picoplankton in Surface Oceans. *Annual Review of Microbiology* *65*, 91–110.
- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T.V., Shevchenko, A., and Schwudke, D. (2008). Lipid extraction by methyl- *tert* -butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research* *49*, 1137–1146.
- Mayer, J.A., and Taylor, F.J.R. (1979). A virus which lyses the marine nanoflagellate *Micromonas pusilla*. *Nature* *281*, 299–301.
- Melayah, D., Bonnivard, E., Chalhoub, B., Audeon, C., and Grandbastien, M.-A. (2001). The mobility of the tobacco Tnt1 retrotransposon correlates with its transcriptional activation by fungal factors: Tnt1 mobility is activated by fungal factors. *The Plant Journal* *28*, 159–168.
- Mène-Saffrané, L., Dubugnon, L., Chételat, A., Stolz, S., Gouhier-Darimont, C., and Farmer, E.E. (2009). Nonenzymatic Oxidation of Trienoic Fatty Acids Contributes to Reactive Oxygen Species Management in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 1702–1708.
- Meyer, D., Herrfurth, C., Brodhun, F., and Feussner, I. (2013). Degradation of lipxygenase-derived oxylipins by glyoxysomes from sunflower and cucumber cotyledons. *BMC Plant Biology* *13*, 177.
- Michaelson, L.V., Zäuner, S., Markham, J.E., Haslam, R.P., Desikan, R., Mugford, S., Albrecht, S., Warnecke, D., Sperling, P., Heinz, E., et al. (2009). Functional Characterization of a Higher Plant

- Sphingolipid $\Delta 4$ -Desaturase: Defining the Role of Sphingosine and Sphingosine-1-Phosphate in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* *149*, 487–498.
- Michaelson, L.V., Napier, J.A., Molino, D., and Faure, J.-D. (2016). Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* *1861*, 1329–1335.
- Middelboe, M. (2000). Bacterial Growth Rate and Marine Virus–Host Dynamics. *Microbial Ecology* *40*, 114–124.
- Middelboe, M., and Brussaard, C. (2017). Marine Viruses: Key Players in Marine Ecosystems. *Viruses* *9*, 302.
- Milrot, E., Shimoni, E., Dadosh, T., Rechav, K., Unger, T., Van Etten, J.L., and Minsky, A. (2017). Structural studies demonstrating a bacteriophage-like replication cycle of the eukaryote-infecting *Paramecium bursaria chlorella virus-1*. *PLOS Pathogens* *13*, e1006562.
- Mimouni, V., Couzinet-Mossion, A., Ulmann, L., and Wielgosz-Collin, G. (2018). Lipids From Microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*, (Elsevier), pp. 109–131.
- Misra, N., Panda, P.K., Parida, B.K., and Mishra, B.K. (2012). Phylogenomic Study of Lipid Genes Involved in Microalgal Biofuel Production—Candidate Gene Mining and Metabolic Pathway Analyses. *Evolutionary Bioinformatics* *8*, EBO.S10159.
- Misra, N., Panda, P.K., and Parida, B.K. (2014). Genome-wide identification and evolutionary analysis of algal LPAT genes involved in TAG biosynthesis using bioinformatic approaches. *Molecular Biology Reports* *41*, 8319–8332.
- Mizutani, M. (2012). Impacts of Diversification of Cytochrome P450 on Plant Metabolism. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* *35*, 824–832.
- Moeder, W., and Yoshioka, K. (2008). Lesion mimic mutants: A classical, yet still fundamental approach to study programmed cell death. *Plant Signaling & Behavior* *3*, 764–767.
- Moellering, E.R., and Benning, C. (2011). Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. *Trends in Plant Science* *16*, 98–107.
- Moellering, E.R., Muthan, B., and Benning, C. (2010). Freezing Tolerance in Plants Requires Lipid Remodeling at the Outer Chloroplast Membrane. *Science* *330*, 226–228.
- Monier, A., Worden, A.Z., and Richards, T.A. (2016). Phylogenetic diversity and biogeography of the Mamiellophyceae lineage of eukaryotic phytoplankton across the oceans: Global diversity of marine class II prasinophytes. *Environmental Microbiology Reports* *8*, 461–469.
- Monnier, A., Liverani, S., Bouvet, R., Jesson, B., Smith, J.Q., Mosser, J., Corellou, F., and Bouget, F.-Y. (2010). Orchestrated transcription of biological processes in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* exposed to light/dark cycles. *BMC Genomics* *11*, 192.
- Moreau, H., Verhelst, B., Couloux, A., Derelle, E., Rombauts, S., Grimsley, N., Van Bel, M., Poulain, J., Katinka, M., Hohmann-Marriott, M.F., et al. (2012). Gene functionalities and genome structure in *Bathycoccus prasinos* reflect cellular specializations at the base of the green lineage. *Genome Biology* *13*, R74.
- Morikawa, T., Mizutani, M., Aoki, N., Watanabe, B., Saga, H., Saito, S., Oikawa, A., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., et al. (2006). Cytochrome P450 *CYP710A* Encodes the Sterol C-22 Desaturase in *Arabidopsis* and Tomato. *The Plant Cell* *18*, 1008–1022.

- Mosblech, A., Feussner, I., and Heilmann, I. (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 511–517.
- Mühlroth, A., Li, K., Røkke, G., Winge, P., Olsen, Y., Hohmann-Marriott, M., Vadstein, O., and Bones, A. (2013). Pathways of Lipid Metabolism in Marine Algae, Co-Expression Network, Bottlenecks and Candidate Genes for Enhanced Production of EPA and DHA in Species of Chromista. *Marine Drugs* 11, 4662–4697.
- Nakashima, A., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Sugimoto, K., Takabayashi, J., and Matsui, K. (2011). Monogalactosyl diacylglycerol is a substrate for lipoxygenase: its implications for oxylipin formation directly from lipids. *Journal of Plant Interactions* 6, 93–97.
- Nelson, D.R., Schuler, M.A., Paquette, S.M., Werck-Reichhart, D., and Bak, S. (2004). Comparative Genomics of Rice and Arabidopsis. Analysis of 727 Cytochrome P450 Genes and Pseudogenes from a Monocot and a Dicot. *Plant Physiology* 135, 756–772.
- Neu, U., Bauer, J., and Stehle, T. (2011). Viruses and sialic acids: rules of engagement. *Current Opinion in Structural Biology* 21, 610–618.
- Newcomer, M.E., and Brash, A.R. (2015). The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis: Specificity in Lipoxygenases. *Protein Science* 24, 298–309.
- Ngo, M.H., Colbourne, T.R., and Ridgway, N.D. (2010). Functional implications of sterol transport by the oxysterol-binding protein gene family. *Biochemical Journal* 429, 13–24.
- Nilsson, A.K., Fahlberg, P., Ellerström, M., and Andersson, M.X. (2012). Oxo-phytodienoic acid (OPDA) is formed on fatty acids esterified to galactolipids after tissue disruption in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 586, 2483–2487.
- Nilsson, A.K., Fahlberg, P., Johansson, O.N., Hamberg, M., Andersson, M.X., and Ellerström, M. (2016). The activity of HYDROPEROXIDE LYASE 1 regulates accumulation of galactolipids containing 12-oxo-phytodienoic acid in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 67, 5133–5144.
- Not, F., Siano, R., Kooistra, W.H.C.F., Simon, N., Vaultot, D., and Probert, I. (2012). Diversity and Ecology of Eukaryotic Marine Phytoplankton. In *Advances in Botanical Research*, (Elsevier), pp. 1–53.
- O’Brien, I.E.W., Baguley, B.C., Murray, B.G., Morris, B.A.M., and Ferguson, I.B. (1998). Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. *The Plant Journal* 13, 803–814.
- Ohlrogge, J., and Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* 7, 957–970.
- Ohlrogge, J.B., Kuhn, D.N., and Stumpf, P.K. (1979). Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 1194–1198.
- Oliw, E.H. (2002). Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68–69, 313–323.
- Patti, G.J., Yanes, O., and Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 263–269.
- Pedde, R.D., Li, H., Borchers, C.H., and Akbari, M. (2017). Microfluidic-Mass Spectrometry Interfaces for Translational Proteomics. *Trends in Biotechnology* 35, 954–970.
- Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L.-J., Bastien, O., Rébeillé, F., Jouhet, J., Falconet, D., Block, M.A., McFadden, G.I., et al. (2014). Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways –

From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research* 54, 68–85.

Phalen, T., and Kielian, M. (1991). Cholesterol is required for infection by Semliki Forest virus. *The Journal of Cell Biology* 112, 615–623.

Philippova, M., Resink, T., Erne, P., and Bochkov, V. (2014). Oxidised phospholipids as biomarkers in human disease. *Swiss Medical Weekly*.

Piacente, F., Gaglianone, M., Laugieri, M., and Tonetti, M. (2015). The Autonomous Glycosylation of Large DNA Viruses. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 29315–29328.

Pinot, F., and Beisson, F. (2011). Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles: Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants. *FEBS Journal* 278, 195–205.

Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., and Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11.

Pohnert, G., Steinke, M., and Tollrian, R. (2007). Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 198–204.

Poli, G., Biasi, F., and Leonarduzzi, G. (2013). Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biology* 1, 125–130.

Pontejo, S.M., and Murphy, P.M. (2019). Mouse Cytomegalovirus Differentially Exploits Cell Surface Glycosaminoglycans in a Cell Type-Dependent and MCK-2-Independent Manner. *Viruses* 12, 31.

Poorvin, L., Rinta-Kanto, J.M., Hutchins, D.A., and Wilhelm, S.W. (2004). Viral release of iron and its bioavailability to marine plankton. *Limnology and Oceanography* 49, 1734–1741.

Porta, H., and Rocha-Sosa, M. (2002). Plant Lipooxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology* 130, 15–21.

Puri, V., Watanabe, R., Dominguez, M., Sun, X., Wheatley, C.L., Marks, D.L., and Pagano, R.E. (1999). Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nature Cell Biology* 1, 386–388.

Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlage, R.E., Boore, J.L., and Posewitz, M.C. (2012). Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nature Communications* 3.

Rani, M.H., Liu, Q., Yu, N., Zhang, Y., Wang, B., Cao, Y., Zhang, Y., Islam, M.A., Zegeye, W.A., Cao, L., et al. (2020). ES5 is involved in the regulation of phosphatidylserine synthesis and impacts on early senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology* 102, 501–515.

Ray, J.L., Haramaty, L., Thyrraug, R., Fredricks, H.F., Van Mooy, B.A.S., Larsen, A., Bidle, K.D., and Sandaa, R.-A. (2014). Virus infection of *Haptolina ericina* and *Phaeocystis pouchetii* implicates evolutionary conservation of programmed cell death induction in marine haptophyte–virus interactions. *Journal of Plankton Research* 36, 943–955.

Raychaudhuri, S., Im, Y.J., Hurley, J.H., and Prinz, W.A. (2006). Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein–related proteins and phosphoinositides. *Journal of Cell Biology* 173, 107–119.

- Rennie, E.A., Ebert, B., Miles, G.P., Cahoon, R.E., Christiansen, K.M., Stonebloom, S., Khatab, H., Twell, D., Petzold, C.J., Adams, P.D., et al. (2014). Identification of a Sphingolipid α -Glucuronosyltransferase That Is Essential for Pollen Function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26, 3314–3325.
- Reverdatto, S., Beilinson, V., and Nielsen, N.C. (1999). A Multisubunit Acetyl Coenzyme A Carboxylase from Soybean. *Plant Physiology* 119, 961–978.
- Reynolds, C.S. (2006). *Ecology of phytoplankton* (Cambridge; New York: Cambridge University Press).
- Riekhof, W.R., Sears, B.B., and Benning, C. (2005). Annotation of Genes Involved in Glycerolipid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the Betaine Lipid Synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell* 4, 242–252.
- Riekhof, W.R., Naik, S., Bertrand, H., Benning, C., and Voelker, D.R. (2014). Phosphate Starvation in Fungi Induces the Replacement of Phosphatidylcholine with the Phosphorus-Free Betaine Lipid Diacylglyceryl- *N, N, N*-Trimethylhomoserine. *Eukaryotic Cell* 13, 749–757.
- Rivera, S.M., Christou, P., and Canela-Garayoa, R. (2014). Identification of carotenoids using mass spectrometry: IDENTIFICATION OF CAROTENOIDS. *Mass Spectrometry Reviews* 33, 353–372.
- Rogowska, A., and Szakiel, A. (2020). The role of sterols in plant response to abiotic stress. *Phytochemistry Reviews*.
- Rohmer, M. (2010). Methylerythritol Phosphate Pathway. In *Comprehensive Natural Products II*, (Elsevier), pp. 517–555.
- Rontein, D., Rhodes, D., and Hanson, A.D. (2003). Evidence from Engineering that Decarboxylation of Free Serine is the Major Source of Ethanolamine Moieties in Plants. *Plant and Cell Physiology* 44, 1185–1191.
- Roossinck, M.J., and Bazán, E.R. (2017). Symbiosis: Viruses as Intimate Partners. *Annual Review of Virology* 4, 123–139.
- Rose, S.L., Fulton, J.M., Brown, C.M., Natale, F., Van Mooy, B.A.S., and Bidle, K.D. (2014). Isolation and characterization of lipid rafts in *E miliania huxleyi* : a role for membrane microdomains in host-virus interactions: Lipid rafts in *Emiliania huxleyi*. *Environmental Microbiology* 16, 1150–1166.
- Rosenwasser, S., Mausz, M.A., Schatz, D., Sheyn, U., Malitsky, S., Aharoni, A., Weinstock, E., Tzfadia, O., Ben-Dor, S., Feldmesser, E., et al. (2014). Rewiring Host Lipid Metabolism by Large Viruses Determines the Fate of *Emiliania huxleyi* , a Bloom-Forming Alga in the Ocean. *The Plant Cell* 26, 2689–2707.
- Rosenwasser, S., Ziv, C., Creveld, S.G. van, and Vardi, A. (2016). Virocell Metabolism: Metabolic Innovations During Host–Virus Interactions in the Ocean. *Trends in Microbiology* 24, 821–832.
- Röst, H.L., Sachsenberg, T., Aiche, S., Bielow, C., Weisser, H., Aichele, F., Andreotti, S., Ehrlich, H.-C., Gutenbrunner, P., Kenar, E., et al. (2016). OpenMS: a flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis. *Nature Methods* 13, 741–748.
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., and Zhang, K. (2019). Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2479.

- Ruiz-Lopez, N., Sayanova, O., Napier, J.A., and Haslam, R.P. (2012). Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* *63*, 2397–2410.
- Rynearson, T.A., and Armbrust, E.V. (2005). Maintenance of clonal diversity during a spring bloom of the centric diatom *Ditylum brightwellii*. *Molecular Ecology* *14*, 1631–1640.
- Saito, K., and Matsuda, F. (2010). Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol* *61*, 463–489.
- Sajed, T., Marcu, A., Ramirez, M., Pon, A., Guo, A.C., Knox, C., Wilson, M., Grant, J.R., Djoumbou, Y., and Wishart, D.S. (2016). ECMDB 2.0: A richer resource for understanding the biochemistry of *E. coli*. *Nucleic Acids Research* *44*, D495–D501.
- Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Tsukuda, T., Shimma, N., Aoki, Y., Arisawa, M., et al. (2005). Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nature Chemical Biology* *1*, 333–337.
- Sakurai, K., Moriyama, T., and Sato, N. (2014). Detailed Identification of Fatty Acid Isomers Sheds Light on the Probable Precursors of Triacylglycerol Accumulation in Photoautotrophically Grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* *13*, 256–266.
- Salvador, B., Sexton, N.R., Carrion, R., Nunneley, J., Patterson, J.L., Steffen, I., Lu, K., Muench, M.O., Lembo, D., and Simmons, G. (2013). Filoviruses Utilize Glycosaminoglycans for Their Attachment to Target Cells. *Journal of Virology* *87*, 3295–3304.
- Sanabria, N.M., Huang, J.-C., and Dubery, I.A. (2010). Self/non-self perception in plants in innate immunity and defense. *Self/Nonsel* *1*, 40–54.
- Saravanan, R.S., Slabaugh, E., Singh, V.R., Lapidus, L.J., Haas, T., and Brandizzi, F. (2009). The targeting of the oxysterol-binding protein ORP3a to the endoplasmic reticulum relies on the plant VAP33 homolog PVA12. *The Plant Journal* *58*, 817–830.
- Sato, N., Tsuzuki, M., and Kawaguchi, A. (2003). Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* *1633*, 27–34.
- Sato, N., Mori, N., Hirashima, T., and Moriyama, T. (2016). Diverse pathways of phosphatidylcholine biosynthesis in algae as estimated by labeling studies and genomic sequence analysis. *The Plant Journal* *87*, 281–292.
- Sattler, S.E., Mène-Saffrané, L., Farmer, E.E., Krischke, M., Mueller, M.J., and DellaPenna, D. (2006). Nonenzymatic Lipid Peroxidation Reprograms Gene Expression and Activates Defense Markers in *Arabidopsis* Tocopherol-Deficient Mutants. *The Plant Cell* *18*, 3706–3720.
- Schäfer, M., Fischer, C., Meldau, S., Seebald, E., Oelmüller, R., and Baldwin, I.T. (2011). Lipase Activity in Insect Oral Secretions Mediates Defense Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* *156*, 1520–1534.
- Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research* *42*, 163–175.
- Schatz, D., Shemi, A., Rosenwasser, S., Sabanay, H., Wolf, S.G., Ben-Dor, S., and Vardi, A. (2014). Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of a DNA virus infecting oceanic algal blooms. *New Phytologist* *204*, 854–863.

- Schatz, D., Rosenwasser, S., Malitsky, S., Wolf, S.G., Feldmesser, E., and Vardi, A. (2017). Communication via extracellular vesicles enhances viral infection of a cosmopolitan alga. *Nature Microbiology* 2, 1485–1492.
- Schaum, E., Rost, B., Millar, A.J., and Collins, S. (2013). Variation in plastic responses of a globally distributed picoplankton species to ocean acidification. *Nature Climate Change* 3, 298–302.
- Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T., and Simons, K. (1999). Influenza Viruses Select Ordered Lipid Domains during Budding from the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry* 274, 2038–2044.
- Schläpfer, P., Zhang, P., Wang, C., Kim, T., Banf, M., Chae, L., Dreher, K., Chavali, A.K., Nilo-Poyanco, R., Bernard, T., et al. (2017). Genome-Wide Prediction of Metabolic Enzymes, Pathways, and Gene Clusters in Plants. *Plant Physiology* 173, 2041–2059.
- Schleyer, G., Shahaf, N., Ziv, C., Dong, Y., Meoded, R.A., Helfrich, E.J.N., Schatz, D., Rosenwasser, S., Rogachev, I., Aharoni, A., et al. (2019). In plaque-mass spectrometry imaging of a bloom-forming alga during viral infection reveals a metabolic shift towards odd-chain fatty acid lipids. *Nature Microbiology* 4, 527–538.
- Schneider, C., Pratt, D.A., Porter, N.A., and Brash, A.R. (2007). Control of Oxygenation in Lipoxygenase and Cyclooxygenase Catalysis. *Chemistry & Biology* 14, 473–488.
- Schoberer, J., and Strasser, R. (2011). Sub-Compartmental Organization of Golgi-Resident N-Glycan Processing Enzymes in Plants. *Molecular Plant* 4, 220–228.
- Schulz, T.A., Choi, M.-G., Raychaudhuri, S., Mears, J.A., Ghirlando, R., Hinshaw, J.E., and Prinz, W.A. (2009). Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues. *The Journal of Cell Biology* 187, 889–903.
- Senthil-Kumar, M., Wang, K., and Mysore, K.S. (2013). AtCYP710A1 gene-mediated stigmaterol production plays a role in imparting temperature stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 8, e23142.
- Shanklin, J., and Somerville, C. (1991). Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 2510–2514.
- Sharon, I., Alperovitch, A., Rohwer, F., Haynes, M., Glaser, F., Atamna-Ismaeel, N., Pinter, R.Y., Partensky, F., Koonin, E.V., Wolf, Y.I., et al. (2009). Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes. *Nature* 461, 258–262.
- Sheyn, U., Rosenwasser, S., Ben-Dor, S., Porat, Z., and Vardi, A. (2016). Modulation of host ROS metabolism is essential for viral infection of a bloom-forming coccolithophore in the ocean. *The ISME Journal* 10, 1742–1754.
- Shi, H., Chen, H., Gu, Z., Song, Y., Zhang, H., Chen, W., and Chen, Y.Q. (2015). Molecular mechanism of substrate specificity for delta 6 desaturase from *Mortierella alpina* and *Micromonas pusilla*. *Journal of Lipid Research* 56, 2309–2321.
- Shieh, J.T.C., and Bergelson, J.M. (2002). Interaction with Decay-Accelerating Factor Facilitates Cocksackievirus B Infection of Polarized Epithelial Cells. *Journal of Virology* 76, 9474–9480.
- Shockey, J.M., Fulda, M.S., and Browse, J.A. (2002). Arabidopsis Contains Nine Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase Genes That Participate in Fatty Acid and Glycerolipid Metabolism. *Plant Physiology* 129, 1710–1722.

- Simionato, D., Block, M.A., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., and Morosinotto, T. (2013). The Response of *Nannochloropsis gaditana* to Nitrogen Starvation Includes *De Novo* Biosynthesis of Triacylglycerols, a Decrease of Chloroplast Galactolipids, and Reorganization of the Photosynthetic Apparatus. *Eukaryotic Cell* 12, 665–676.
- Simmons, G., Rennekamp, A.J., Chai, N., Vandenberghe, L.H., Riley, J.L., and Bates, P. (2003). Folate Receptor Alpha and Caveolae Are Not Required for Ebola Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *Journal of Virology* 77, 13433–13438.
- Simon-Plas, F., Perraki, A., Bayer, E., Gerbeau-Pissot, P., and Mongrand, S. (2011). An update on plant membrane rafts. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 642–649.
- Smallwood, C.R., Chrisler, W., Chen, J.-H., Patello, E., Thomas, M., Boudreau, R., Ekman, A., Wang, H., McDermott, G., and Evans, J.E. (2018). *Ostreococcus tauri* is a high-lipid content green alga that extrudes clustered lipid droplets (Cell Biology).
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry* 78, 779–787.
- Sobhy, H. (2017). A comparative review of viral entry and attachment during large and giant dsDNA virus infections. *Archives of Virology* 162, 3567–3585.
- Somerville, C., and Browse, J. (1991). Plant Lipids: Metabolism, Mutants, and Membranes. *Science* 252, 80–87.
- Song, L.-Y., Zhang, Y., Li, S.-F., Hu, J., Yin, W.-B., Chen, Y.-H., Hao, S.-T., Wang, B.-L., Wang, R.R.-C., and Hu, Z.-M. (2014). Identification of the substrate recognition region in the $\Delta 6$ -fatty acid and $\Delta 8$ -sphingolipid desaturase by fusion mutagenesis. *Planta* 239, 753–763.
- Song, W.C., Funk, C.D., and Brash, A.R. (1993). Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8519–8523.
- Spencer, R. (1955). A Marine Bacteriophage. *Nature* 175, 690–691.
- Sperling, P., Ternes, P., Zank, T.K., and Heinz, E. (2003). The evolution of desaturases. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68, 73–95.
- Sperling, P., Franke, S., Lüthje, S., and Heinz, E. (2005). Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 1031–1038.
- Stelmach, B.A., Müller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M., and Weiler, E.W. (2001). A Novel Class of Oxylipins, *sn* 1- *O* -(12-Oxophytodienoyl)- *sn* 2- *O* -(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl Diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12832–12838.
- Sterck, L., Billiau, K., Abeel, T., Rouzé, P., and Van de Peer, Y. (2012). ORCAE: online resource for community annotation of eukaryotes. *Nature Methods* 9, 1041–1041.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 12837–12842.
- Stray, S.J., Cummings, R.D., and Air, G.M. (2000). Influenza virus infection of desialylated cells. *Glycobiology* 10, 649–658.

- Subirana, L., Péquin, B., Michely, S., Escande, M.-L., Meilland, J., Derelle, E., Marin, B., Piganeau, G., Desdevises, Y., Moreau, H., et al. (2013). Morphology, Genome Plasticity, and Phylogeny in the Genus *Ostreococcus* Reveal a Cryptic Species, *O. mediterraneus* sp. nov. (Mamiellales, Mamiellophyceae). *Protist* 164, 643–659.
- Sun, M., Yang, Z., and Wawrik, B. (2018). Metabolomic Fingerprints of Individual Algal Cells Using the Single-Probe Mass Spectrometry Technique. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Sunda, W., Kieber, D.J., Kiene, R.P., and Huntsman, S. (2002). An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature* 418, 317–320.
- Suttle, C.A. (2007). Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5, 801–812.
- Tafesse, F.G., and Holthuis, J.C.M. (2010). A brake on lipid synthesis. *Nature* 463, 1028–1029.
- Takahashi, T., and Suzuki, T. (2011). Function of Membrane Rafts in Viral Lifecycles and Host Cellular Response. *Biochemistry Research International* 2011, 1–23.
- Takahashi, Y., Berberich, T., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Kusano, T., and Terauchi, R. (2009). Serine Palmitoyltransferase, the First Step Enzyme in Sphingolipid Biosynthesis, Is Involved in Nonhost Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 31–38.
- Tang, H., Kawabata, A., Takemoto, M., Yamanishi, K., and Mori, Y. (2008). Human herpesvirus-6 infection induces the reorganization of membrane microdomains in target cells, which are required for virus entry. *Virology* 378, 265–271.
- Tarutani, K., Nagasaki, K., and Yamaguchi, M. (2006). Virus adsorption process determines virus susceptibility in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquatic Microbial Ecology* 42, 209–213.
- Taujale, R., Venkat, A., Huang, L.-C., Zhou, Z., Yeung, W., Rasheed, K.M., Li, S., Edison, A.S., Moremen, K.W., and Kannan, N. (2020). Deep evolutionary analysis reveals the design principles of fold A glycosyltransferases. *ELife* 9.
- Tavares, S., Grotkjær, T., Obsen, T., Haslam, R.P., Napier, J.A., and Gunnarsson, N. (2011). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Production of Eicosapentaenoic Acid, Using a Novel $\Delta 5$ -Desaturase from *Paramecium tetraurelia*. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1854–1861.
- Ternes, P., Sperling, P., Albrecht, S., Franke, S., Cregg, J.M., Warnecke, D., and Heinz, E. (2006). Identification of Fungal Sphingolipid C9-methyltransferases by Phylogenetic Profiling. *Journal of Biological Chemistry* 281, 5582–5592.
- Thingstad, T.F., Pree, B., Giske, J., and Våge, S. (2015). What difference does it make if viruses are strain-, rather than species-specific? *Frontiers in Microbiology* 6.
- Thomas, R., Grimsley, N., Escande, M., Subirana, L., Derelle, E., and Moreau, H. (2011). Acquisition and maintenance of resistance to viruses in eukaryotic phytoplankton populations: Viral resistance in *Mamiellales*. *Environmental Microbiology* 13, 1412–1420.
- Thompson, L.R., Zeng, Q., Kelly, L., Huang, K.H., Singer, A.U., Stubbe, J., and Chisholm, S.W. (2011). Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, E757–E764.
- Thyrhaug, R., Larsen, A., Thingstad, T., and Bratbak, G. (2003). Stable coexistence in marine algal host-virus systems. *Marine Ecology Progress Series* 254, 27–35.

- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., and DellaPenna, D. (2004). The Arabidopsis LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid -ring hydroxylation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 402–407.
- Tidhar, R., Zelnik, I.D., Volpert, G., Ben-Dor, S., Kelly, S., Merrill, A.H., and Futerman, A.H. (2018). Eleven residues determine the acyl chain specificity of ceramide synthases. *Journal of Biological Chemistry* *293*, 9912–9921.
- Tomaru, Y., Mizumoto, H., and Nagasaki, K. (2009). Virus resistance in the toxic bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to single-stranded RNA virus infection. *Environmental Microbiology* *11*, 2915–2923.
- Tragin, M., and Vaultot, D. (2019). Novel diversity within marine Mamiellophyceae (Chlorophyta) unveiled by metabarcoding. *Scientific Reports* *9*.
- Tsugawa, H., Ikeda, K., Takahashi, M., Satoh, A., Mori, Y., Uchino, H., Okahashi, N., Yamada, Y., Tada, I., Bonini, P., et al. (2020). A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nature Biotechnology*.
- Tzipilevich, E., Habusha, M., and Ben-Yehuda, S. (2017). Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors. *Cell* *168*, 186-199.e12.
- Umate, P. (2011). Oxysterol binding proteins (OSBPs) and their encoding genes in Arabidopsis and rice. *Steroids* *76*, 524–529.
- Urbanelli, L., Buratta, S., Tancini, B., Sagini, K., Delo, F., Porcellati, S., and Emiliani, C. (2019). The Role of Extracellular Vesicles in Viral Infection and Transmission. *Vaccines* *7*, 102.
- Valitova, J.N., Sulkarnayeva, A.G., and Minibayeva, F.V. (2016). Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry (Moscow)* *81*, 819–834.
- Van Etten, J.L., Lane, L.C., and Meints, R.H. (1991). Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae. *Microbiol Rev* *55*, 586–620.
- Van Etten, J.L., Lane, L.C., and Dunigan, D.D. (2010). DNA Viruses: The Really Big Ones (Giruses). *Annual Review of Microbiology* *64*, 83–99.
- Van Etten, J.L., Agarkova, I.V., and Dunigan, D.D. (2019). Chloroviruses. *Viruses* *12*, 20.
- Van Etten, J.L., Dunigan, D.D., Nagasaki, K., Schroeder, D.C., Grimsley, N., Brussaard, C.P.D., and Nissimov, J.I. (2020). Phycodnaviruses (Phycodnaviridae). In *Reference Module in Life Sciences*, (Elsevier), p.
- Van Bel, M., Diels, T., Vancaester, E., Kreft, L., Botzki, A., Van de Peer, Y., Coppens, F., and Vandepoele, K. (2018). PLAZA 4.0: an integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics. *Nucleic Acids Research* *46*, D1190–D1196.
- Vance, J.E. (2006). Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann-Pick C disease. *FEBS Letters* *580*, 5518–5524.
- Vanmierlo, T., Husche, C., Schött, H.F., Pettersson, H., and Lütjohann, D. (2013). Plant sterol oxidation products – Analogs to cholesterol oxidation products from plant origin? *Biochimie* *95*, 464–472.
- Vardi, A., Van Mooy, B.A.S., Fredricks, H.F., Popendorf, K.J., Ossolinski, J.E., Haramaty, L., and Bidle, K.D. (2009). Viral Glycosphingolipids Induce Lytic Infection and Cell Death in Marine Phytoplankton. *Science* *326*, 861–865.

- Vardi, A., Haramaty, L., Van Mooy, B.A.S., Fredricks, H.F., Kimmance, S.A., Larsen, A., and Bidle, K.D. (2012). Host-virus dynamics and subcellular controls of cell fate in a natural coccolithophore population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 19327–19332.
- de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahe, F., Logares, R., Lara, E., Berney, C., Le Bescot, N., Probert, I., et al. (2015). Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* *348*, 1261605–1261605.
- Vaulot, D., Eikrem, W., Viprey, M., and Moreau, H. (2008). The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* *32*, 795–820.
- Verhelst, B., Van de Peer, Y., and Rouz , P. (2013). The Complex Intron Landscape and Massive Intron Invasion in a Picoeukaryote Provides Insights into Intron Evolution. *Genome Biology and Evolution* *5*, 2393–2401.
- Vidoudez, C., and Pohnert, G. (2012). Comparative metabolomics of the diatom *Skeletonema marinoi* in different growth phases. *Metabolomics* *8*, 654–669.
- Viswanath, K.K., Varakumar, P., Pamuru, R.R., Basha, S.J., Mehta, S., and Rao, A.D. (2020). Plant Lipoxygenases and Their Role in Plant Physiology. *Journal of Plant Biology* *63*, 83–95.
- Vogel, G., and Eichenberger, W. (1992). Betaine Lipids in Lower Plants. Biosynthesis of DGTS and DGTA in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) and the Possible Role of DGTS in Lipid Metabolism. *Plant and Cell Physiology*.
- Voineagu, I., Narayanan, V., Lobachev, K.S., and Mirkin, S.M. (2008). Replication stalling at unstable inverted repeats: Interplay between DNA hairpins and fork stabilizing proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 9936–9941.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Ch telat, A., and Farmer, E.E. (2008). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves: Michael addition acceptors in plant disease. *The Plant Journal* *24*, 467–476.
- Vu, H.S., Tamura, P., Galeva, N.A., Chaturvedi, R., Roth, M.R., Williams, T.D., Wang, X., Shah, J., and Welti, R. (2012). Direct Infusion Mass Spectrometry of Oxylin-Containing Arabidopsis Membrane Lipids Reveals Varied Patterns in Different Stress Responses. *Plant Physiology* *158*, 324–339.
- Wagner, M., Hoppe, K., Czabany, T., Heilmann, M., Daum, G., Feussner, I., and Fulda, M. (2010). Identification and characterization of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*. *Plant Physiology and Biochemistry* *48*, 407–416.
- Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.-M., Kang, L., and Mysore, K.S. (2012). Phytosterols Play a Key Role in Plant Innate Immunity against Bacterial Pathogens by Regulating Nutrient Efflux into the Apoplast. *Plant Physiology* *158*, 1789–1802.
- Wang, K., Guo, Q., Froehlich, J.E., Hersh, H.L., Zienkiewicz, A., Howe, G.A., and Benning, C. (2018). Two Abscisic Acid-Responsive Plastid Lipase Genes Involved in Jasmonic Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* *30*, 1006–1022.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapon, C.A., Luzzatto-Knaan, T., et al. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* *34*, 828–837.

- Wang, P., Duan, W., Munn, A.L., and Yang, H. (2005). Molecular characterization of Osh6p, an oxysterol binding protein homolog in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal* 272, 4703–4715.
- Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J.E., Tsegaye, Y., Dunn, T.M., Wang, G.-L., Bellizzi, M., Parsons, J.F., et al. (2008). An Inositolphosphorylceramide Synthase Is Involved in Regulation of Plant Programmed Cell Death Associated with Defense in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 3163–3179.
- Wasternack, C., and Feussner, I. (2018). The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annual Review of Plant Biology* 69, 363–386.
- Wasternack, C., and Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* 111, 1021–1058.
- Wasternack, C., and Strnad, M. (2016). Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. *New Biotechnology* 33, 604–613.
- Waterbury, J.B., and Valois, F.W. (1993). Resistance to co-occurring phages enables marine synechococcus communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3393–3399.
- Waters, R.E., and Chan, A.T. (1982). Micromonas pusilla Virus: the Virus Growth Cycle and Associated Physiological Events Within the Host Cells; Host Range Mutation. *Journal of General Virology* 63, 199–206.
- Weynberg, K., Allen, M., and Wilson, W. (2017). Marine Prasinoviruses and Their Tiny Plankton Hosts: A Review. *Viruses* 9, 43.
- White, S.W., Zheng, J., Zhang, Y.-M., and Rock, C.O. (2005). THE STRUCTURAL BIOLOGY OF TYPE II FATTY ACID BIOSYNTHESIS. *Annual Review of Biochemistry* 74, 791–831.
- Wilhelm, S.W., and Suttle, C.A. (1999). Viruses and Nutrient Cycles in the Sea. *BioScience* 49, 781–788.
- Wilson, W.H. (2005). Complete Genome Sequence and Lytic Phase Transcription Profile of a Coccolithovirus. *Science* 309, 1090–1092.
- Wilson, W.H., Tarran, G.A., Schroeder, D., Cox, M., Oke, J., and Malin, G. (2002). Isolation of viruses responsible for the demise of an *Emiliania huxleyi* bloom in the English Channel. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 82, 369–377.
- Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Marcu, A., Guo, A.C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., et al. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research* 46, D608–D617.
- Woolley, P.S., Moir, A.J., Hester, R.E., and Keely, B.J. (1998). A comparative study of the allomerization reaction of chlorophyll a and bacteriochlorophyll a. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1833–1840.
- Worden, A.Z., Nolan, J.K., and Palenik, B. (2004). Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: The importance of the eukaryotic component. *Limnology and Oceanography* 49, 168–179.

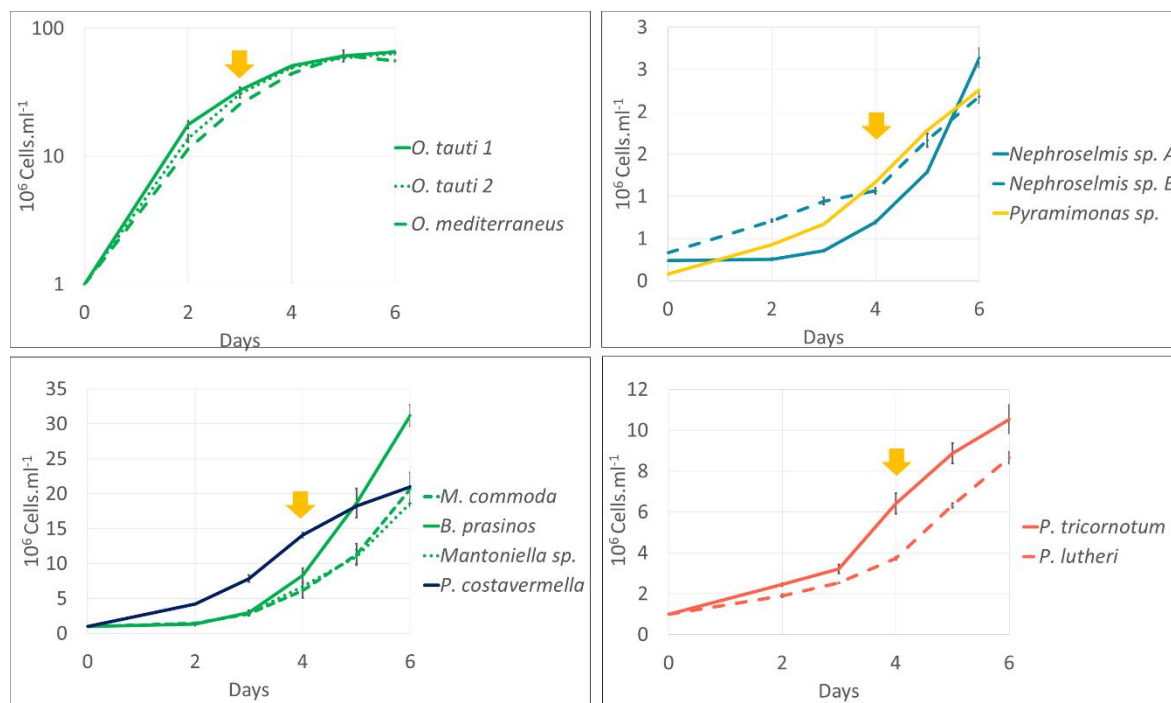
- Worden, A.Z., Follows, M.J., Giovannoni, S.J., Wilken, S., Zimmerman, A.E., and Keeling, P.J. (2015). Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science* *347*, 1257594–1257594.
- Wudiri, G.A., Pritchard, S.M., Li, H., Liu, J., Aguilar, H.C., Gilk, S.D., and Nicola, A.V. (2014). Molecular Requirement for Sterols in Herpes Simplex Virus Entry and Infectivity. *Journal of Virology* *88*, 13918–13922.
- Xu, J., Wang, X., and Guo, W. (2015). The cytochrome P450 superfamily: Key players in plant development and defense. *Journal of Integrative Agriculture* *14*, 1673–1686.
- Yanai-Balser, G.M., Duncan, G.A., Eudy, J.D., Wang, D., Li, X., Agarkova, I.V., Dunigan, D.D., and Van Etten, J.L. (2010). Microarray Analysis of *Paramecium bursaria* Chlorella Virus 1 Transcription. *Journal of Virology* *84*, 532–542.
- Yang, W., Devaiah, S.P., Pan, X., Isaac, G., Welti, R., and Wang, X. (2007). AtPLAI Is an Acyl Hydrolase Involved in Basal Jasmonic Acid Production and *Arabidopsis* Resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 18116–18128.
- Yang, W.-Y., Zheng, Y., Bahn, S.C., Pan, X.-Q., Li, M.-Y., Vu, H.S., Roth, M.R., Scheu, B., Welti, R., Hong, Y.-Y., et al. (2012). The Patatin-Containing Phospholipase A pPLAI α Modulates Oxylinin Formation and Water Loss in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* *5*, 452–460.
- Yau, S., Hemon, C., Derelle, E., Moreau, H., Piganeau, G., and Grimsley, N. (2016). A Viral Immunity Chromosome in the Marine Picoeukaryote, *Ostreococcus tauri*. *PLOS Pathogens* *12*, e1005965.
- Yau, S., Krasovec, M., Benites, L.F., Rombauts, S., Groussin, M., Vancaester, E., Aury, J.-M., Derelle, E., Desdevises, Y., Escande, M.-L., et al. (2020). Virus-host coexistence in phytoplankton through the genomic lens. *Science Advances* *6*, eaay2587.
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Ciniglia, C., Pinto, G., and Bhattacharya, D. (2004). A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* *21*, 809–818.
- Yu, B., and Benning, C. (2003). Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* *36*, 762–770.
- Yutin, N., and Koonin, E.V. (2009). Evolution of DNA ligases of Nucleo-Cytoplasmic Large DNA viruses of eukaryotes: a case of hidden complexity. *Biology Direct* *4*, 51.
- Zervudacki, J., Yu, A., Amesefe, D., Wang, J., Drouaud, J., Navarro, L., and Deleris, A. (2018). Transcriptional control and exploitation of an immune-responsive family of plant retrotransposons. *The EMBO Journal* *37*.
- Zhang, X., Xiang, Y., Dunigan, D.D., Klose, T., Chipman, P.R., Van Etten, J.L., and Rossmann, M.G. (2011). Three-dimensional structure and function of the *Paramecium bursaria* chlorella virus capsid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 14837–14842.
- Zhang, Z., He, G., Filipowicz, N.A., Randall, G., Belov, G.A., Kopek, B.G., and Wang, X. (2019). Host Lipids in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Frontiers in Microbiology* *10*.
- Zheng, G., Li, L., and Li, W. (2016). Glycerolipidome responses to freezing- and chilling-induced injuries: examples in *Arabidopsis* and rice. *BMC Plant Biology* *16*.
- Zienkiewicz, K., Du, Z.-Y., Ma, W., Vollheyde, K., and Benning, C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* *1861*, 1269–1281.

Ziv, C., Malitsky, S., Othman, A., Ben-Dor, S., Wei, Y., Zheng, S., Aharoni, A., Hornemann, T., and Vardi, A. (2016). Viral serine palmitoyltransferase induces metabolic switch in sphingolipid biosynthesis and is required for infection of a marine alga. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *113*, E1907–E1916.

Zoeller, M., Stingl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S., and Mueller, M.J. (2012). Lipid Profiling of the Arabidopsis Hypersensitive Response Reveals Specific Lipid Peroxidation and Fragmentation Processes: Biogenesis of Pimelic and Azelaic Acid. *Plant Physiology* *160*, 365–378.

Zulu, N.N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., and Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research* *70*, 1–16.

FIGURES SUPPLEMENTAIRES DU CHAPITRE II



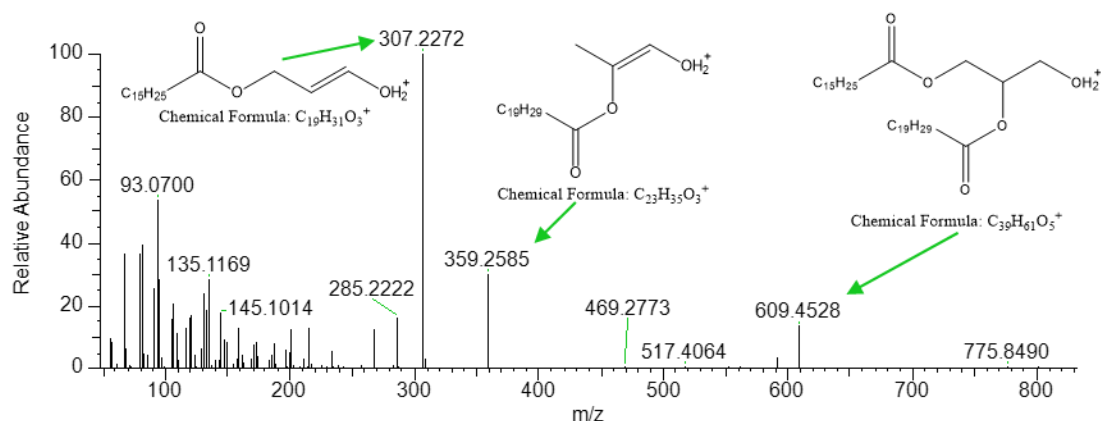
Supplementary Figure S1: Microalgae concentration growth curves over time. Yellow arrows: metabolite extraction was performed at 3 days post-inoculation for *Ostreococcus* species and 4 days post inoculation for the others. RCC for Roscoff Culture Collection numbers for strain identification.

Supplementary Table S1: Algal and bacterial concentration (cells.ml⁻¹) at sampling day for the twelve algae species.

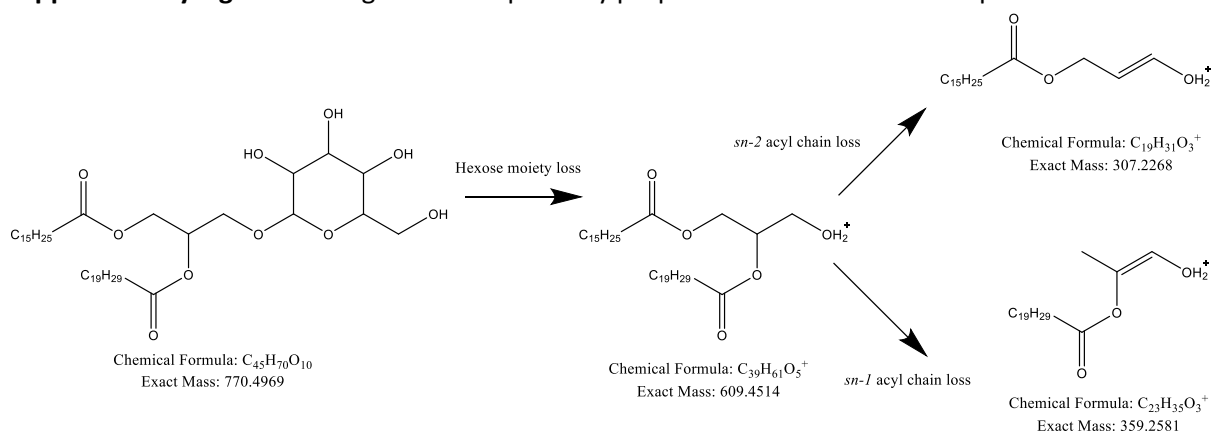
Species	RCC number	Algal cell concentration (Cells.ml ⁻¹) mean ± sd	Bacterial cell concentration (Cells.ml ⁻¹) mean ± sd	Bacteria proportion (%)	Sampling day post inoculation
<i>O. tauri 1</i>	6850	32×10 ⁶ ± 1.7×10 ⁶	2.6×10 ⁴ ± 0.2×10 ⁴	0.07	3
<i>O. tauri 1</i>	4221	30×10 ⁶ ± 2.1×10 ⁶	6.1×10 ⁴ ± 0.6×10 ⁴	0.2	3
<i>O. mediterraneus</i>	2590	25×10 ⁶ ± 0.1×10 ⁶	5.6×10 ⁴ ± 0.8×10 ³	0.2	3
<i>B. prasinos</i>	4222	8.3×10 ⁶ ± 0.9×10 ⁶	5.0×10 ⁵ ± 0.7×10 ⁵	5.7	4
<i>M. commoda</i>	827	2.8×10 ⁶ ± 0.3×10 ⁶	2.7×10 ⁶ ± 0.3×10 ⁶	49	4
<i>Mantoniella</i> sp.	6849	2.9×10 ⁶ ± 0.1×10 ⁶	2.5×10 ⁶ ± 1.9×10 ⁶	46	4
<i>Pyramimonas</i> sp.	6848	6.7×10 ⁵ ± 0.3×10 ⁵	6.2×10 ⁵ ± 1.7×10 ⁵	48	4
<i>Nephroselmis</i> sp. A	6846	3.5×10 ⁵ ± 0.1×10 ⁵	3.3×10 ⁶ ± 0.2×10 ⁶	90	4
<i>Nephroselmis</i> sp. B	6847	9.4×10 ⁵ ± 0.4×10 ⁵	8.4×10 ⁵ ± 0.4×10 ⁴	8.2	4
<i>P. costavermella</i>	4223	14×10 ⁶ ± 0.3×10 ⁶	1.5×10 ⁶ ± 1.3×10 ⁶	9.7	4
<i>P. lutheri</i>	6852	2.5×10 ⁶ ± 0.3×10 ⁴	3.5×10 ⁶ ± 0.2×10 ⁶	58	4
<i>P. tricornotum</i>	6851	3.2×10 ⁶ ± 0.2×10 ⁶	0.4×10 ⁵ ± 0.9×10 ⁴	1.4	4

Supplementary Figure S2: Compound M3629 – 771.5048 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 8.976$ min – $C_{45}H_{70}O_{10}$ – MGDG 16:3/20:5

Phaeo_3 #2316 RT: 8.97 AV: 1 NL: 3.76E+007
T: FTMS + c ESI d Full ms2 788.5318@hcd30.00 [54.6667-820.0000]

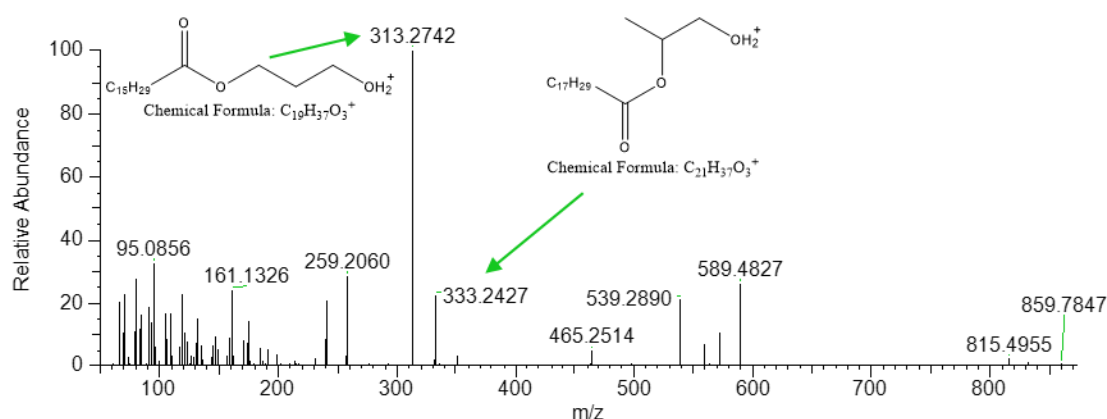


Supplementary Figure S3: Fragmentation pathway proposed for MGDG class compounds:

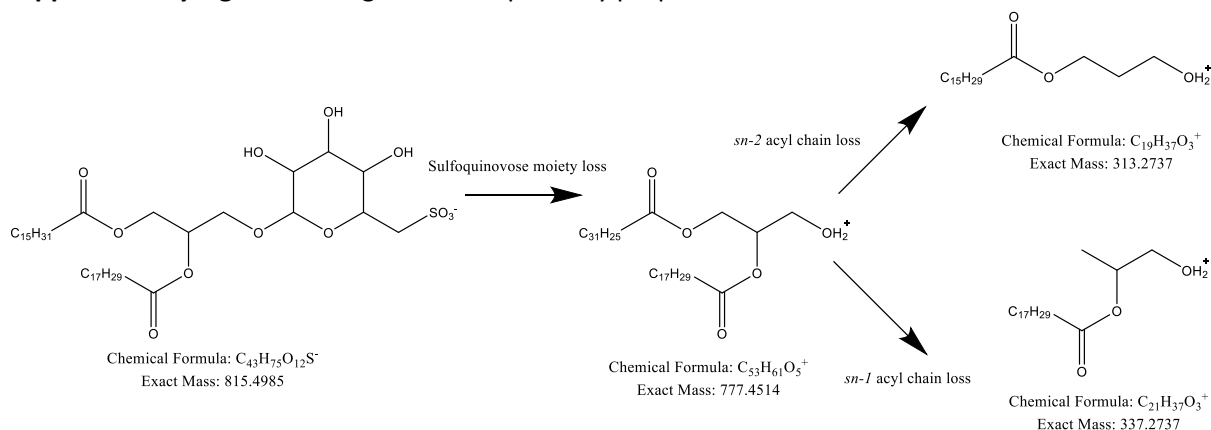


Supplementary Figure S4: Compound M5273 – 815.4985 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 9.167$ min – $C_{43}H_{74}SO_{12}$ – SQDG 16:0/18:4

4222_2 #2865 RT: 11.13 AV: 1 NL: 2.91E+006
T: FTMS + c ESI d Full ms2 832.5256@hcd30.00 [57.6667-865.0000]

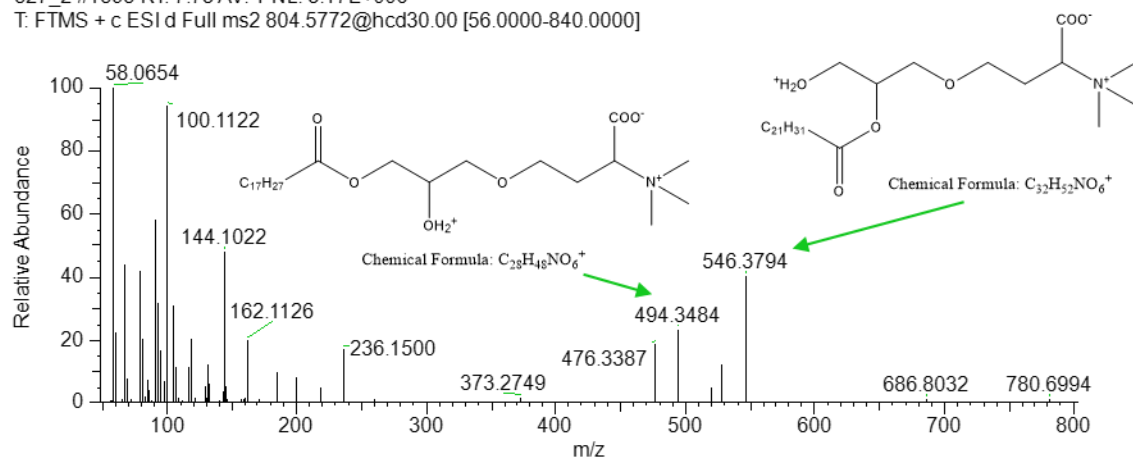


Supplementary Figure S5: Fragmentation pathway proposed for SQDG

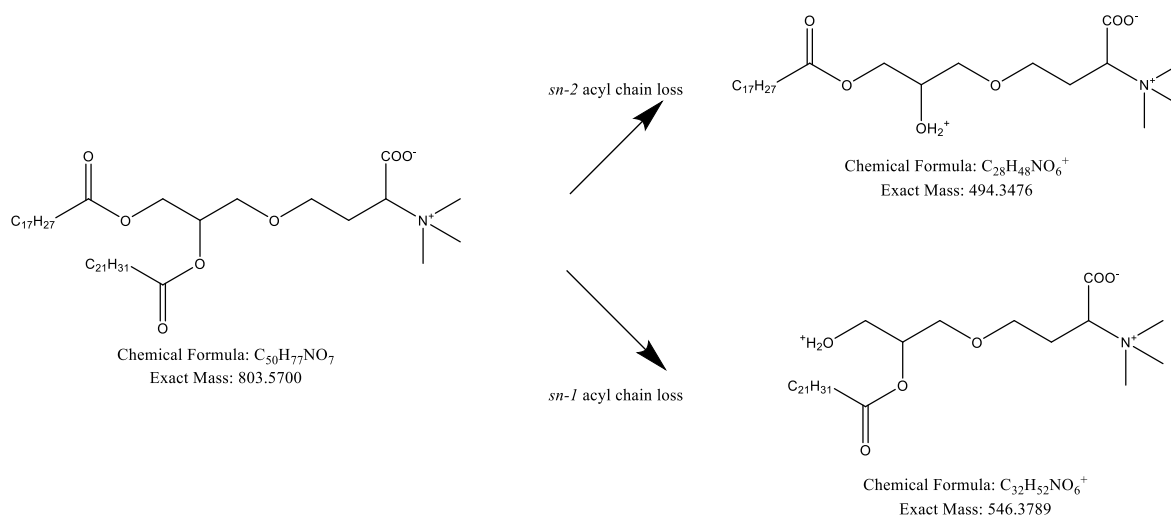


Supplementary Figure S6: Compound M2531 – 804.578 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 8.976$ min – $C_{50}H_{77}NO_7$ – DGTS 18:4/22:6

827_2 #1898 RT: 7.73 AV: 1 NL: 3.17E+006
T: FTMS + c ESI d Full ms2 804.5772@hcd30.00 [56.0000-840.0000]



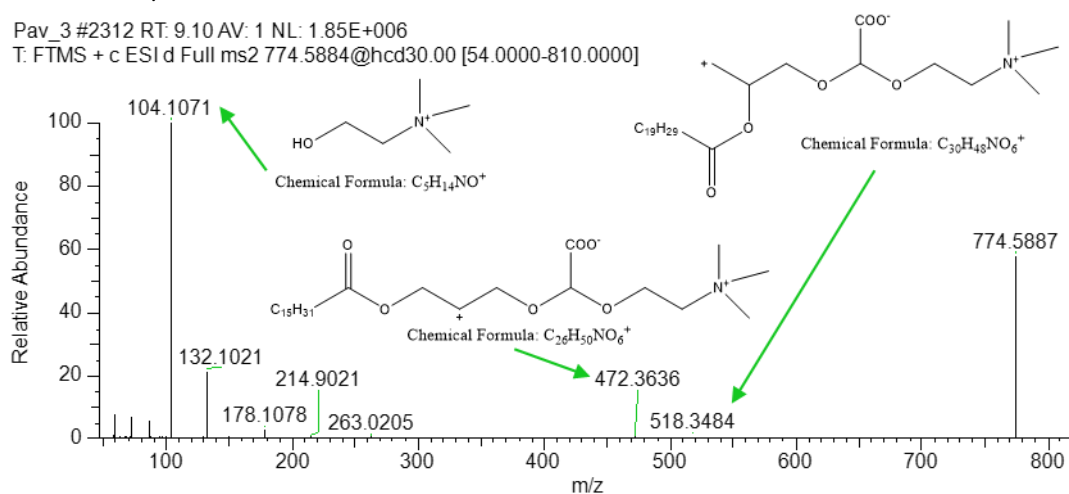
Supplementary Figure S7: Fragmentation pathway proposed for DGTA/S class compounds



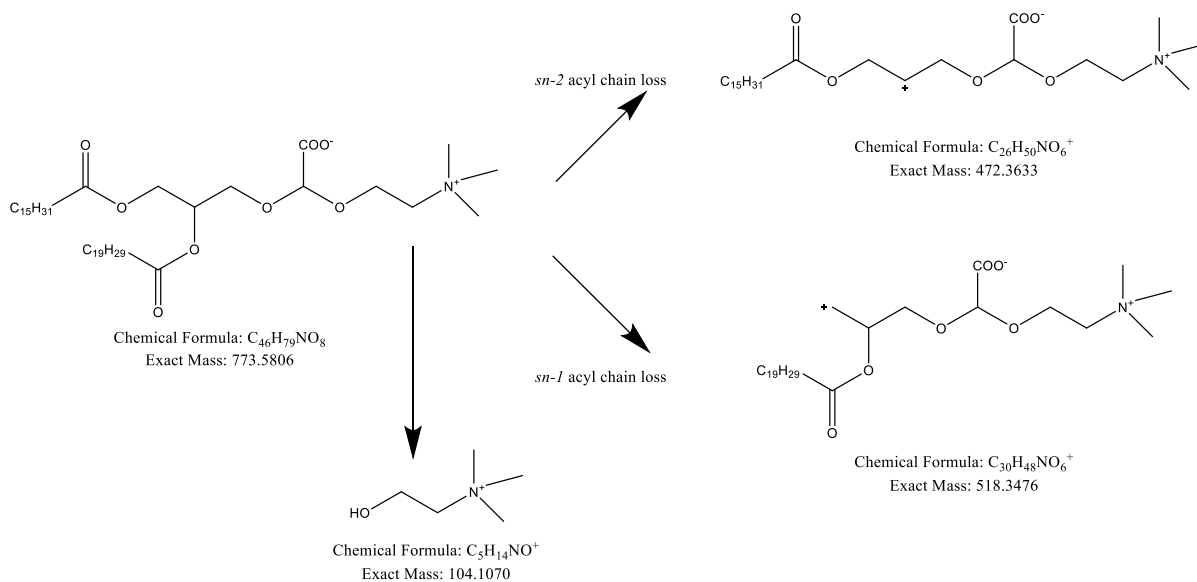
Supplementary Figure S8: Compound M3834 – 774.5888 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 9.167$ min – $C_{46}H_{79}NO_8$ – DGCC 16:0/20:5

Pav_3 #2312 RT: 9.10 AV: 1 NL: 1.85E+006

T: FTMS + c ESI d Full ms2 774.5884@hcd30.00 [54.0000-810.0000]



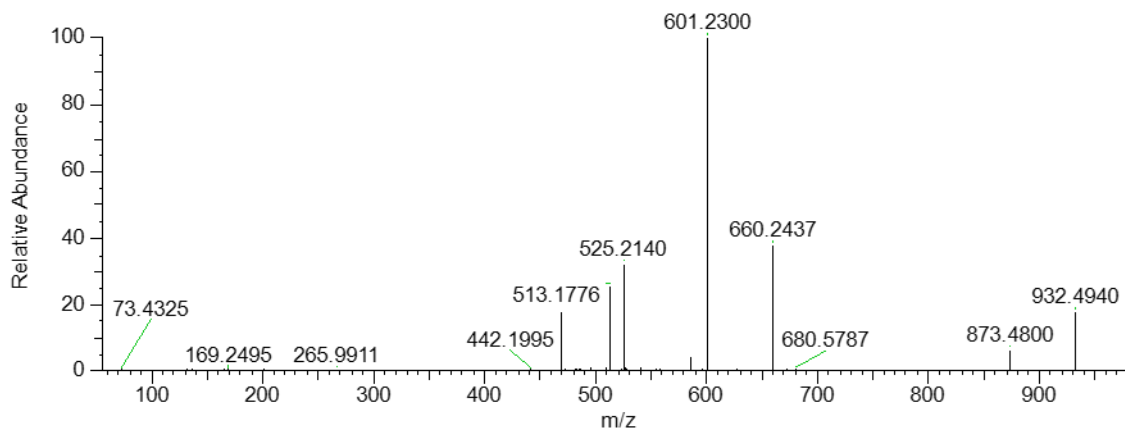
Supplementary Figure S9: Fragmentation pathway proposed for DGCC



Supplementary Figure S10: Compound M6284 – 932.4940 m/z – $[M]^+$ – $R_t = 13.397$ min – $C_{56}H_{68}MgN_4O_7$ – Chlorophyll a derivative 1

4222_2 #3557 RT: 13.53 AV: 1 NL: 2.12E+007

T: FTMS + c ESI d Full ms2 932.4946@hcd30.00 [64.6667-970.0000]

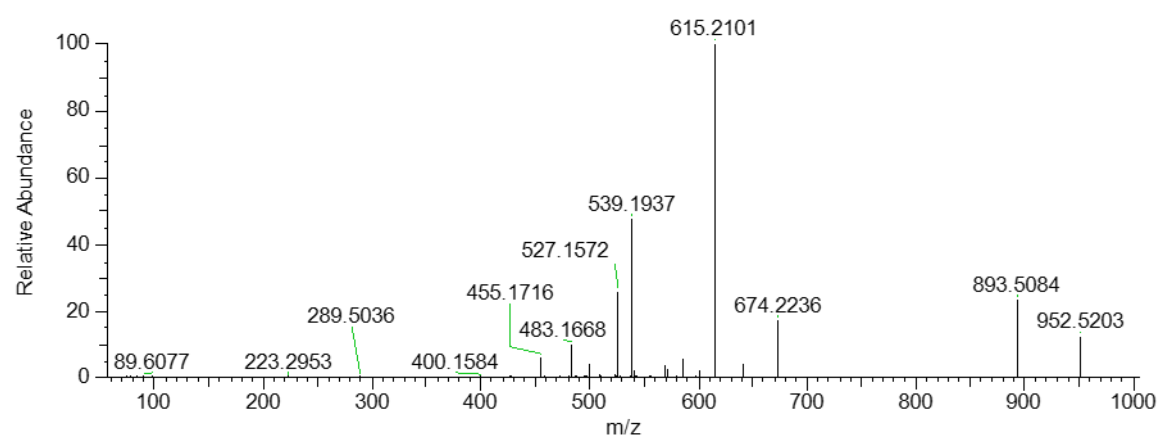


Supplementary Figure S11: Compound M6982 – 952.5200 m/z – $[M]^+$ – $R_t = 15.072$ min –

$C_{56}H_{72}MgN_4O_8$ – Chlorophyll a derivative 2

A551_1 #3984 RT: 15.03 AV: 1 NL: 3.43E+007

T: FTMS + c ESI d Full ms2 952.5202@hcd30.00 [66.0000-990.0000]

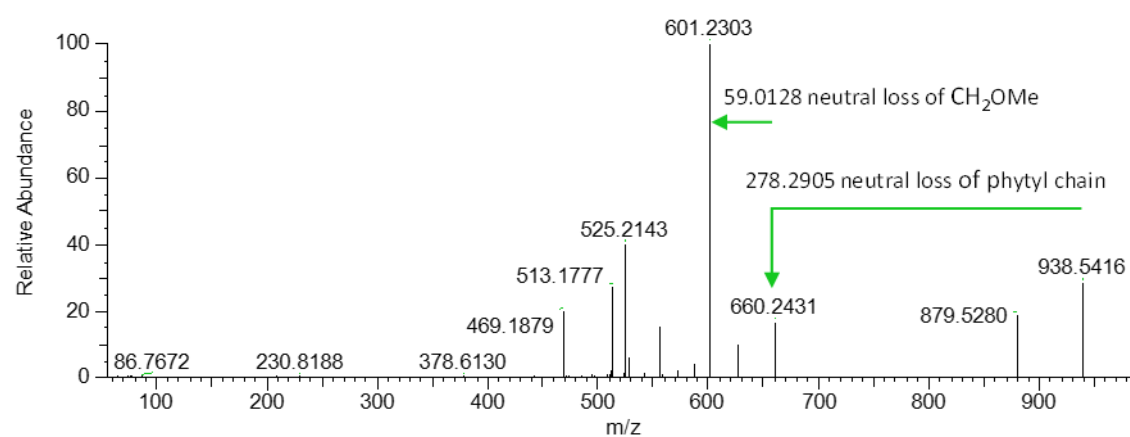


Supplementary Figure S12: Compound M7441 – 938.5412 m/z – $[M]^+$ – $R_t = 16.286$ min –

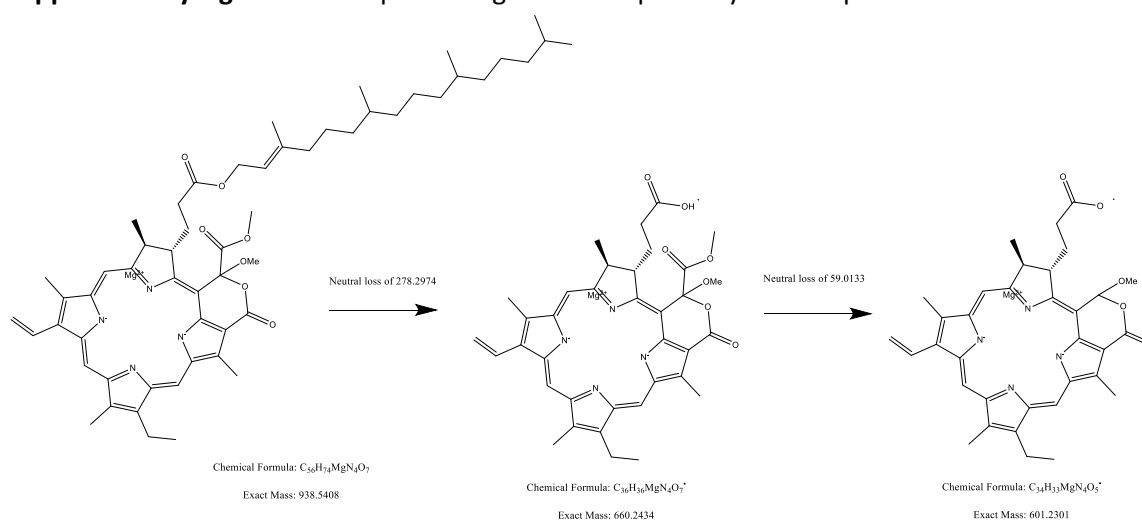
$C_{56}H_{74}MgN_4O_7$ – Chlorophyll a derivative 3

4222_2 #4311 RT: 16.20 AV: 1 NL: 2.33E+006

T: FTMS + c ESI d Full ms2 938.5413@hcd30.00 [65.0000-975.0000]

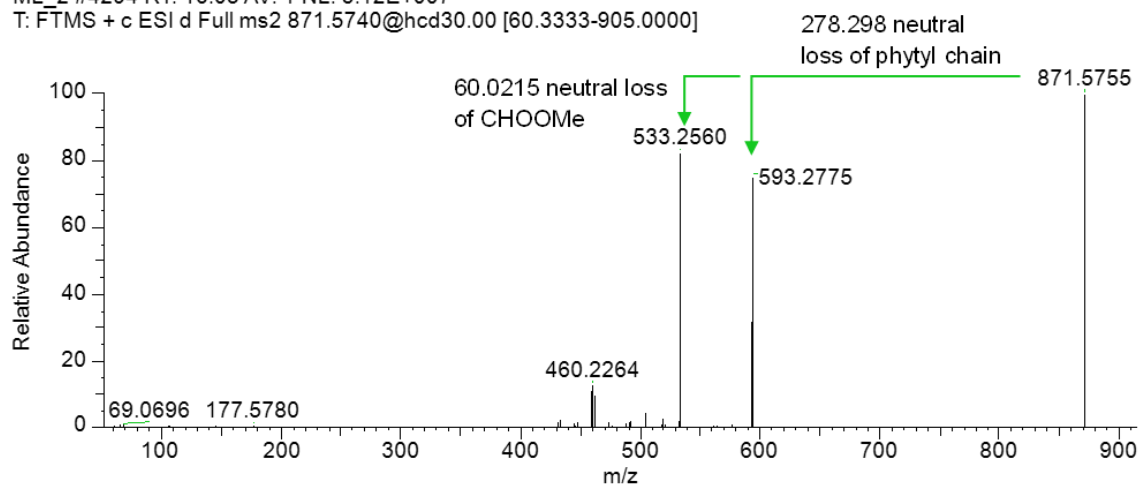


Supplementary Figure S13: Proposed fragmentation pathway for Compound M7441

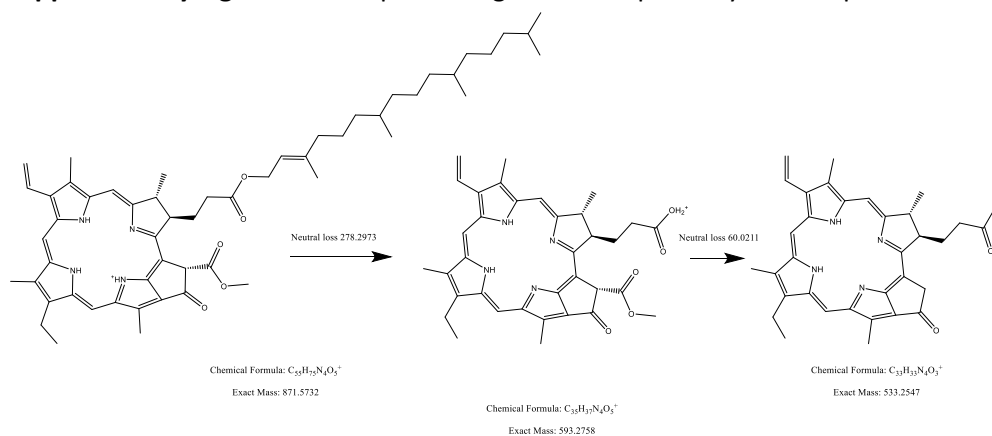


Supplementary Figure S14: Compound 7354 – 871.5740 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 16.096$ min – $C_{55}H_{74}N_4O_5$
 – Pheophytin a isomer 1

ML_2 #4294 RT: 16.05 AV: 1 NL: 3.12E+007
 T: FTMS + c ESI d Full ms2 871.5740@hcd30.00 [60.3333-905.0000]

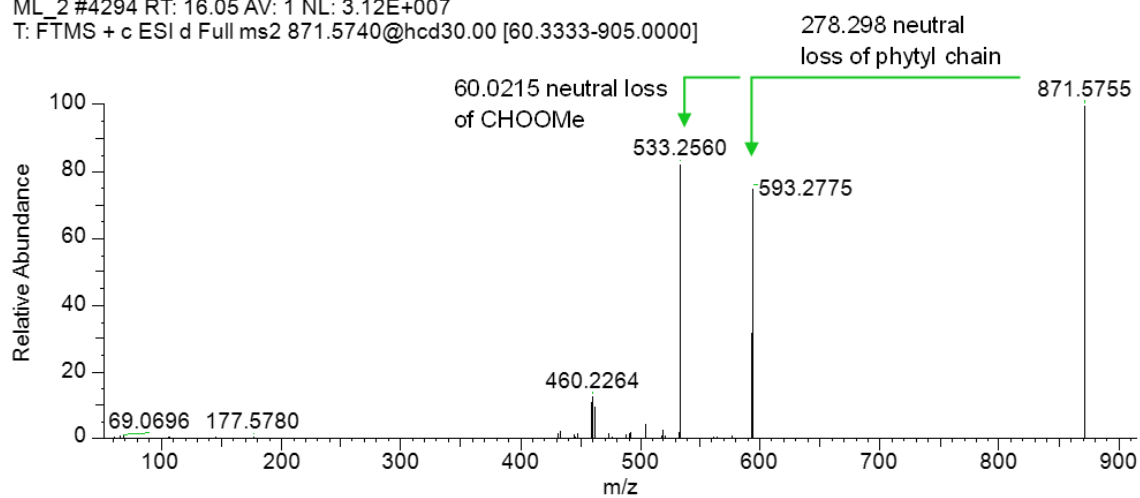


Supplementary Figure S15: Proposed fragmentation pathway for Compound M7354



Supplementary Figure S16: Compound 7377 – 871.5740 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 16.169$ min – $C_{55}H_{74}N_4O_5$
 – Pheophytin a isomer 2

ML_2 #4294 RT: 16.05 AV: 1 NL: 3.12E+007
 T: FTMS + c ESI d Full ms2 871.5740@hcd30.00 [60.3333-905.0000]

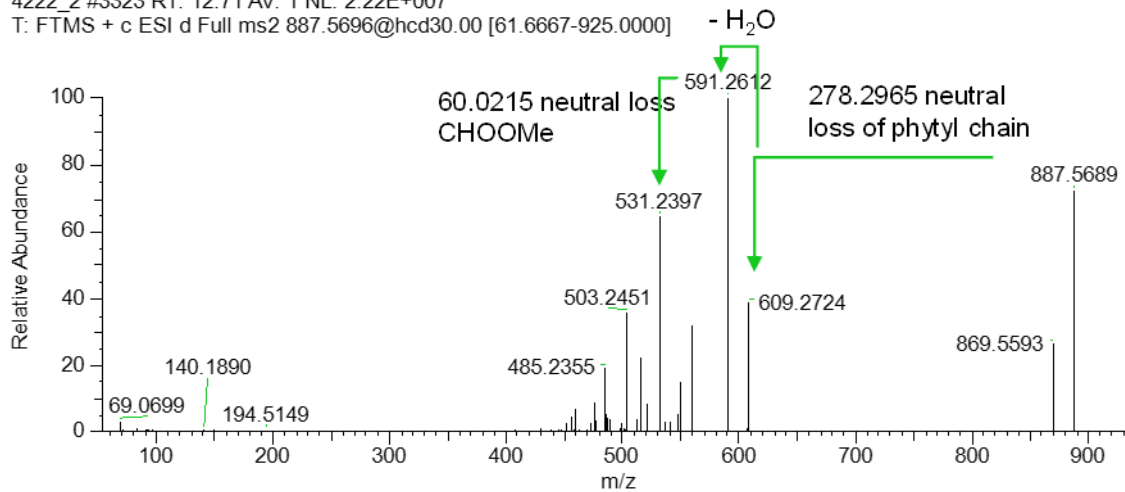


Supplementary Figure S17: Compound M5963 – 887.5688 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 12.658$ min –

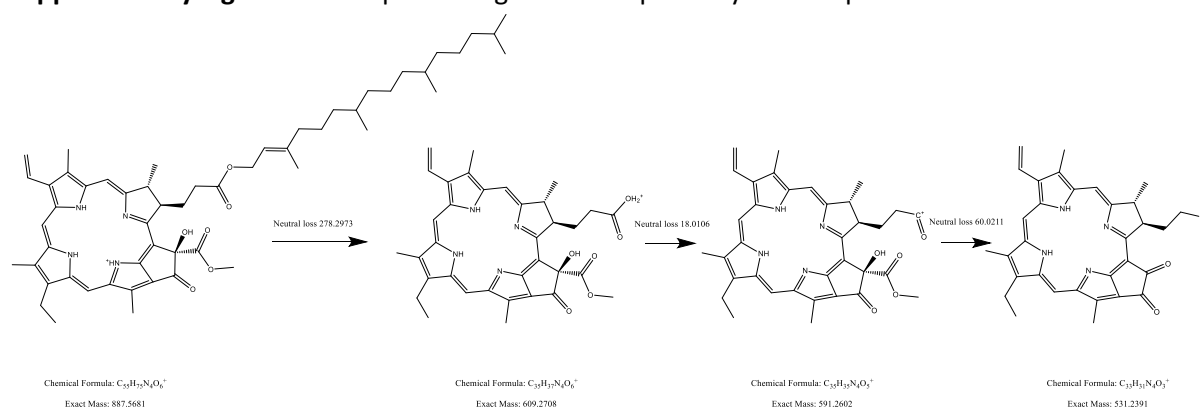
$C_{55}H_{74}N_4O_6$ – Hydroxy-pheophytin isomer 1

4222_2 #3323 RT: 12.71 AV: 1 NL: 2.22E+007

T: FTMS + c ESI d Full ms2 887.5696@hcd30.00 [61.6667-925.0000]



Supplementary Figure S18: Proposed fragmentation pathway for Compound M5963

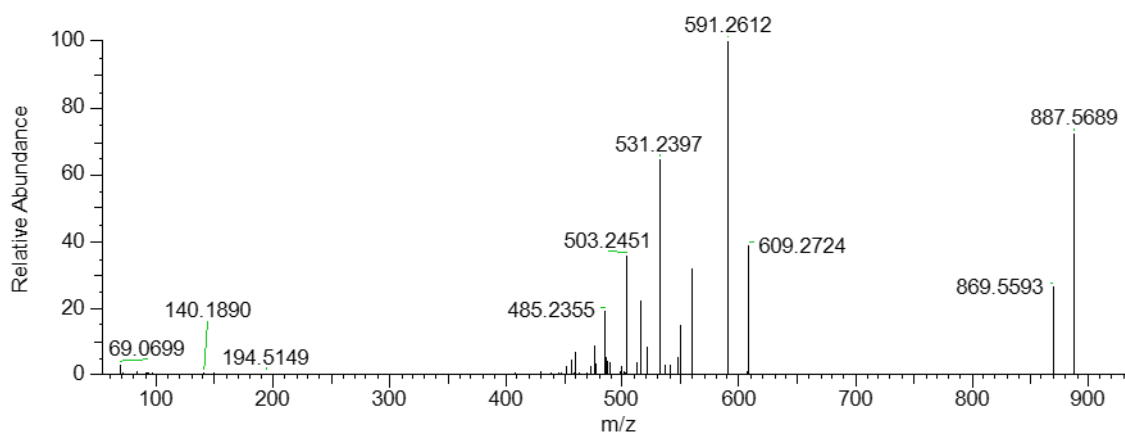


Supplementary Figure S19: Compound M6021 – 887.5688 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 12.779$ min –

$C_{55}H_{74}N_4O_6$ – Hydroxy-pheophytin isomer 2

4222_2 #3323 RT: 12.71 AV: 1 NL: 2.22E+007

T: FTMS + c ESI d Full ms2 887.5696@hcd30.00 [61.6667-925.0000]

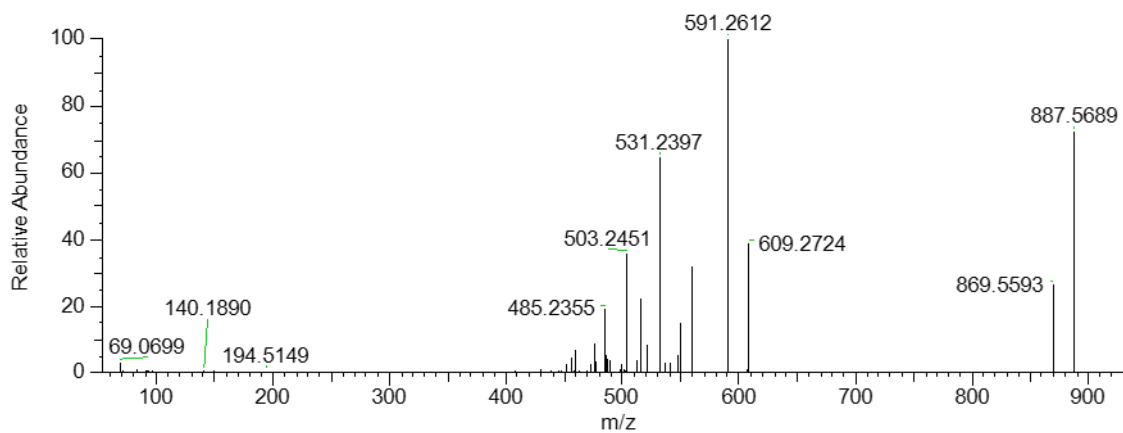


Supplementary Figure S20: Compound M6695 – 887.5688 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 14.279$ min –

$C_{55}H_{74}N_4O_6$ – Hydroxy-pheophytin isomer 3

4222_2 #3323 RT: 12.71 AV: 1 NL: 2.22E+007

T: FTMS + c ESI d Full ms2 887.5696@hcd30.00 [61.6667-925.0000]

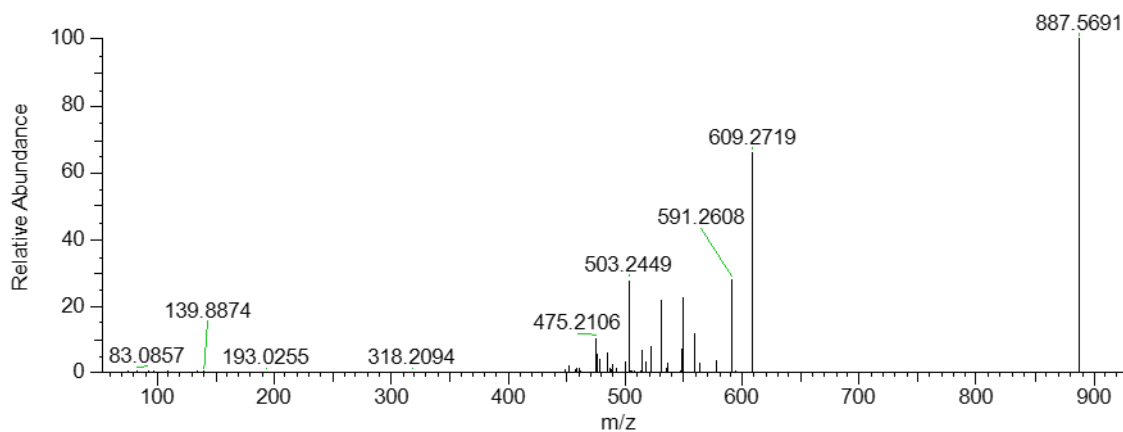


Supplementary Figure S20: Compound M6726 – 887.5688 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 14.396$ min –

$C_{55}H_{74}N_4O_6$ – Hydroxy-pheophytin isomer 4

4222_2 #3781 RT: 14.32 AV: 1 NL: 1.12E+007

T: FTMS + c ESI d Full ms2 887.5694@hcd30.00 [61.6667-925.0000]

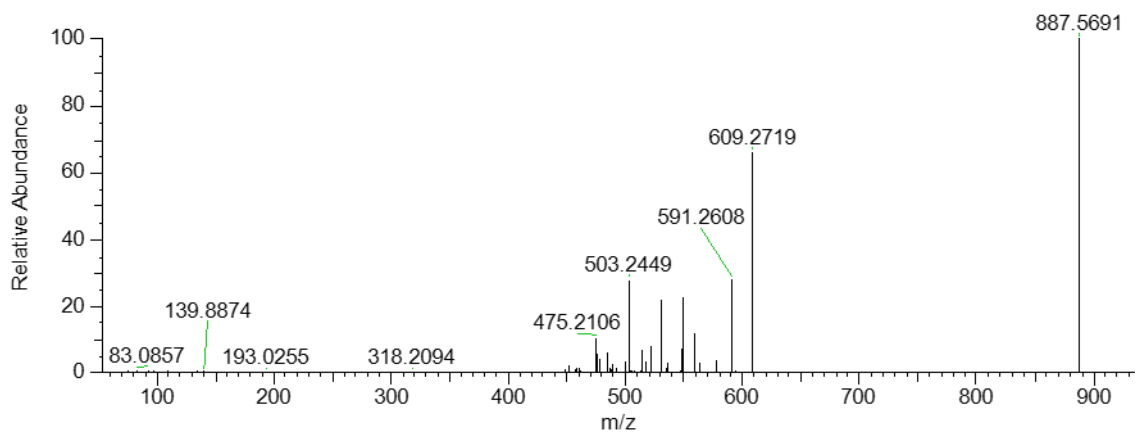


Supplementary Figure S21: Compound M2385 – 593.2763 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 7.626$ min –

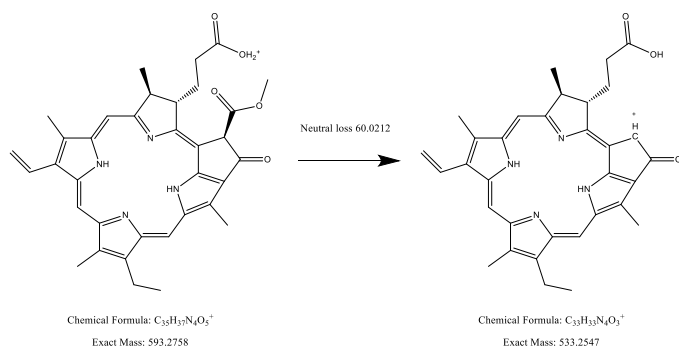
$C_{35}H_{36}N_4O_5$ – Pheophorbide a isomer 1

4222_2 #3781 RT: 14.32 AV: 1 NL: 1.12E+007

T: FTMS + c ESI d Full ms2 887.5694@hcd30.00 [61.6667-925.0000]



Supplementary Figure S22: Proposed fragmentation pathway for Compound M2385:

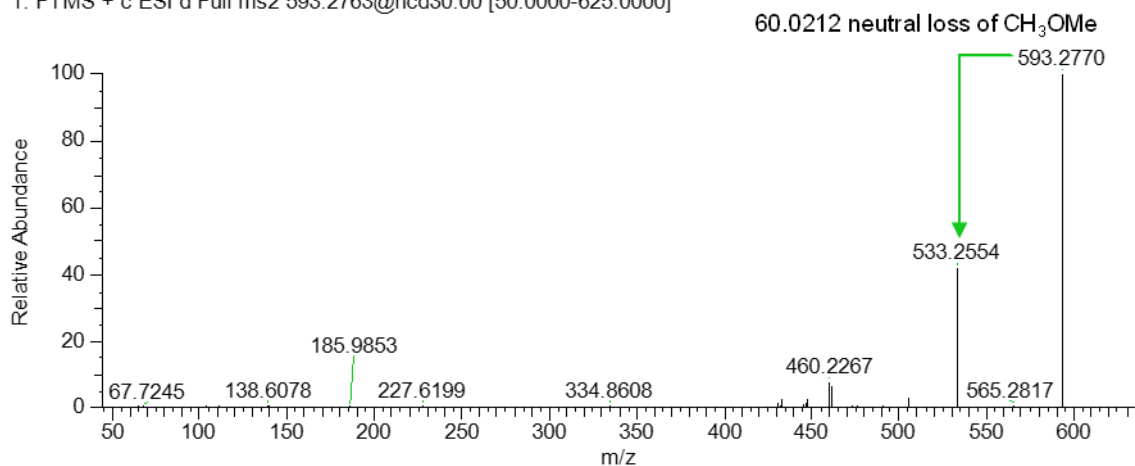


Supplementary Figure S23: Compound M2789 – 593.2763 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 8.064$ min –

$C_{35}H_{36}N_4O_5$ – Pheophorbide a isomer 2

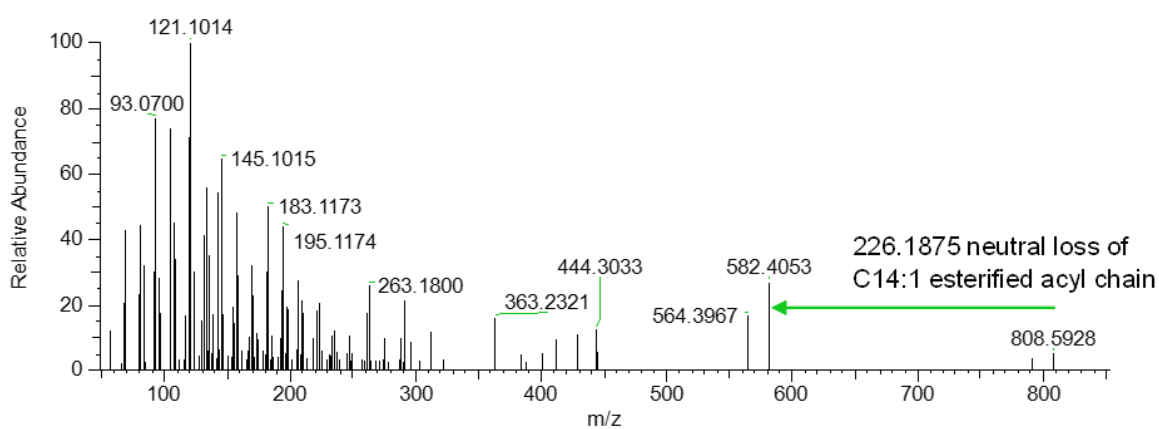
4223_3 #2038 RT: 8.10 AV: 1 NL: 5.43E+007

T: FTMS + c ESI d Full ms2 593.2763@hcd30.00 [50.0000-625.0000]

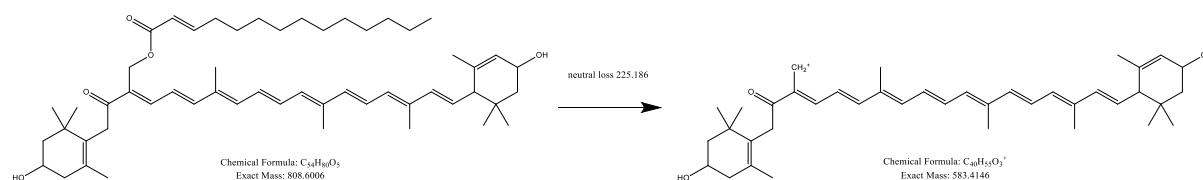


Supplementary Figure S24: Compound M6441– 808.6011 m/z – $[M]^+$ – $R_t = 13.721$ min – $C_{54}H_{80}O_5$ – Siphonaxanthin ester 14:1

A551_2 #3561 RT: 13.70 AV: 1 NL: 2.01E+005
T: FTMS + c ESI d Full ms2 808.6011@hcd30.00 [56.0000-840.0000]

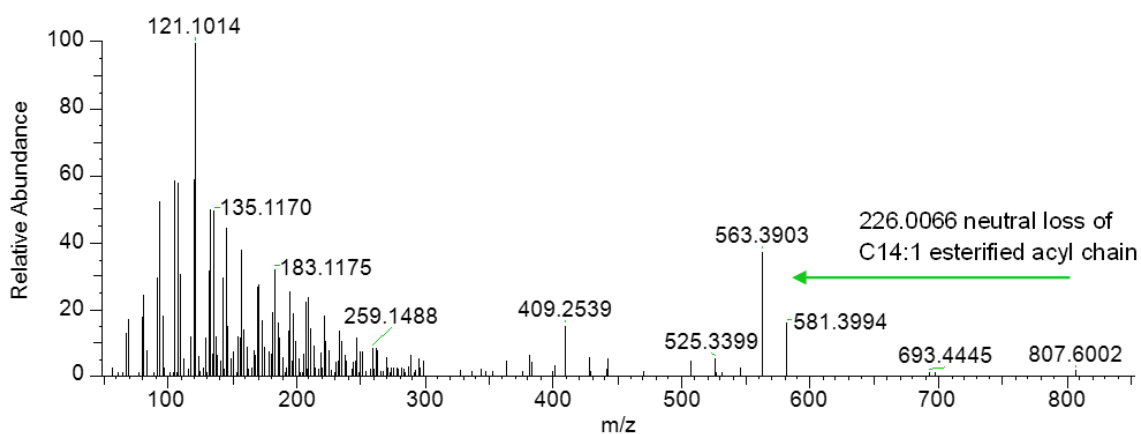


Supplementary Figure S25: Proposed fragmentation pattern for Siphonaxanthin ester 14:1



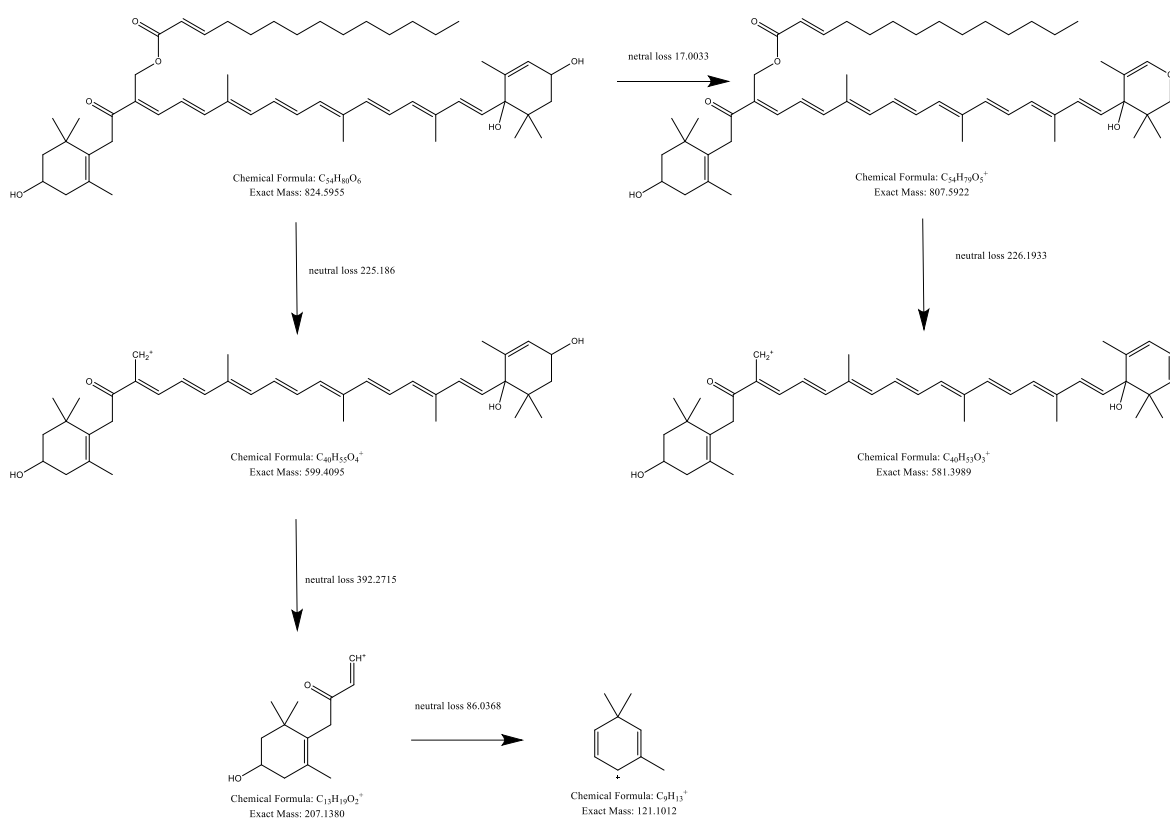
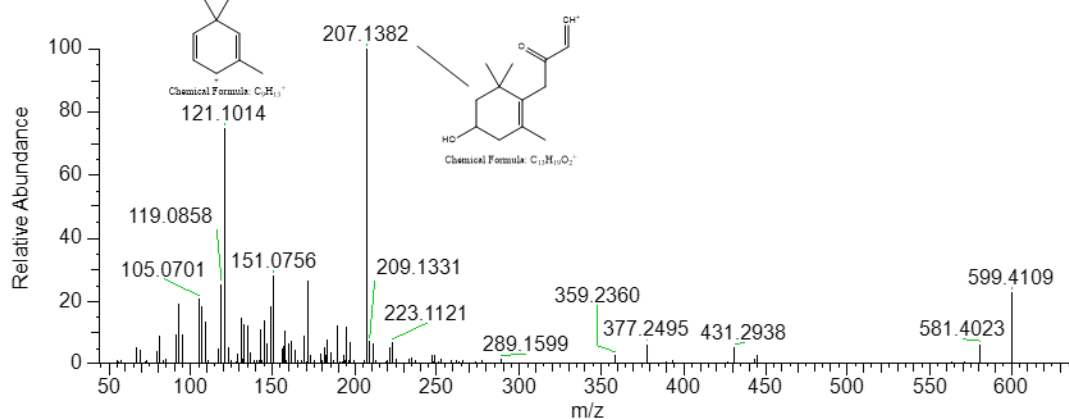
Supplementary Figure S26: Compound M5328– 807.5936 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 11.231$ min – $C_{54}H_{80}O_6$ – Hydro-siphonaxanthin ester 14:1

A551_1 #2874 RT: 11.17 AV: 1 NL: 8.73E+005
T: FTMS + c ESI d Full ms2 807.5936@hcd30.00 [56.0000-840.0000]



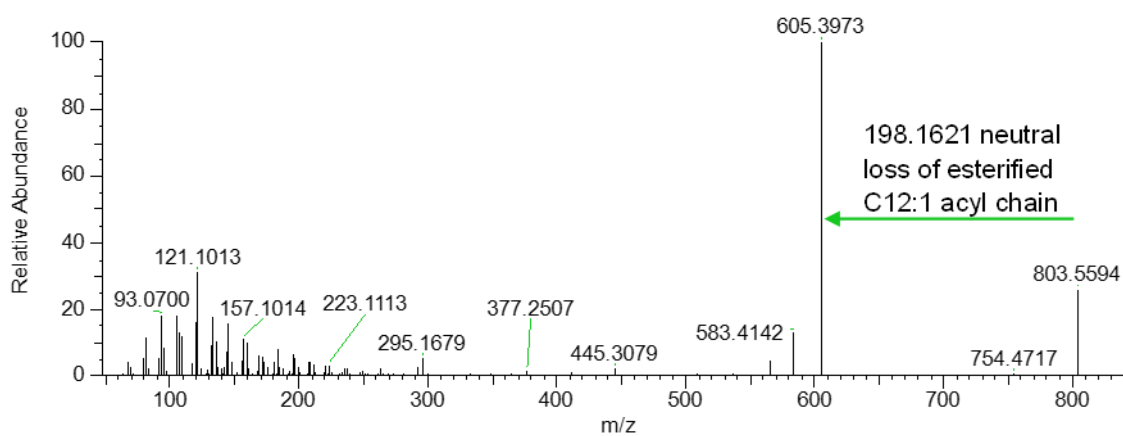
Supplementary Figure S27: Mass spectra and fragmentation pattern of Siphonaxanthin

A551_1 #2870 RT: 11.15 AV: 1 NL: 1.14E+006
T: FTMS + c ESI d Full ms2 599.4097@hcd30.00 [50.0000-630.0000]

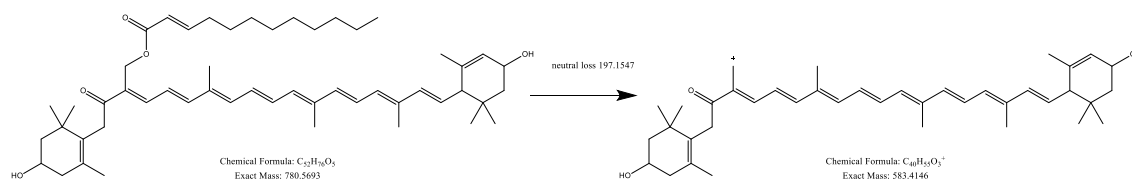


Supplementary Figure S28: Compound M5763 – 803.5596 m/z – $[M+Na]^+$ – $R_t = 12.187$ min – $C_{52}H_{76}O_5$ – Siphonein

A553_3 #3242 RT: 12.11 AV: 1 NL: 1.05E+006
T: FTMS + c ESI d Full ms2 803.5600@hcd30.00 [55.6667-835.0000]

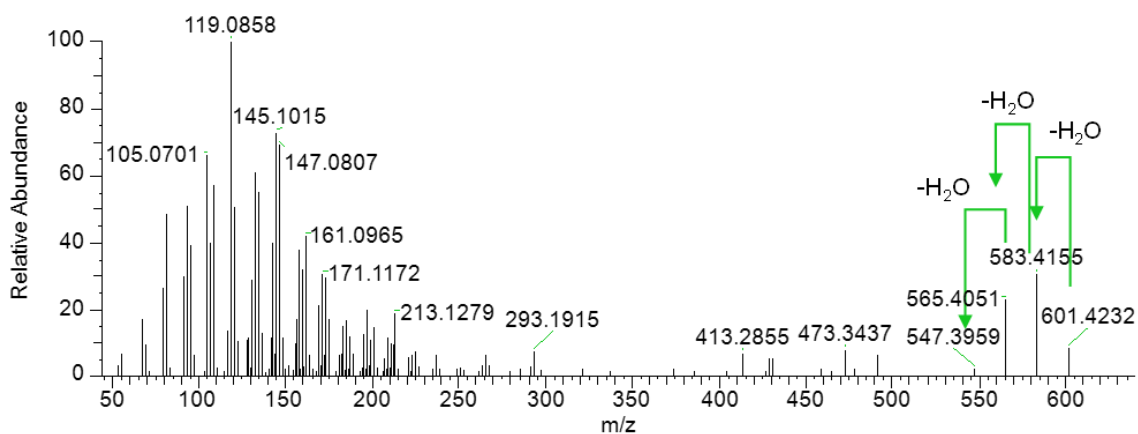


Supplementary Figure S29: Fragmentation pattern of Siphonein



Supplementary Figure S30: Compound M2546 – 601.4246 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 7.787$ min – $C_{40}H_{56}O_4$ – Prasinoxanthin

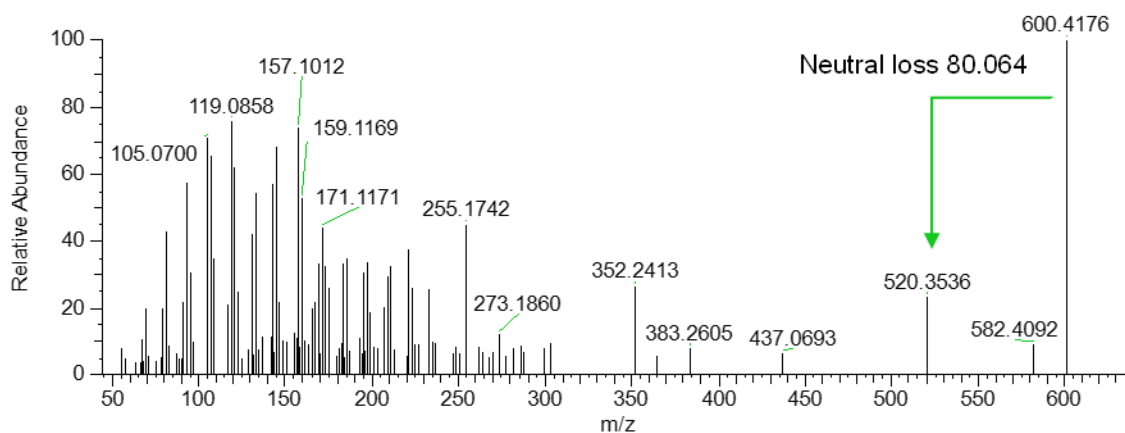
4221_2 #1933 RT: 7.77 AV: 1 NL: 1.12E+006
T: FTMS + c ESI d Full ms2 601.4246@hcd30.00 [50.0000-630.0000]



Supplementary Figure S31: M1889 – 600.4174 m/z – $[M]^+$ – $R_t = 7.03$ min – $C_{40}H_{56}O_4$ – Violaxanthin

ML_2 #1714 RT: 7.06 AV: 1 NL: 6.43E+005

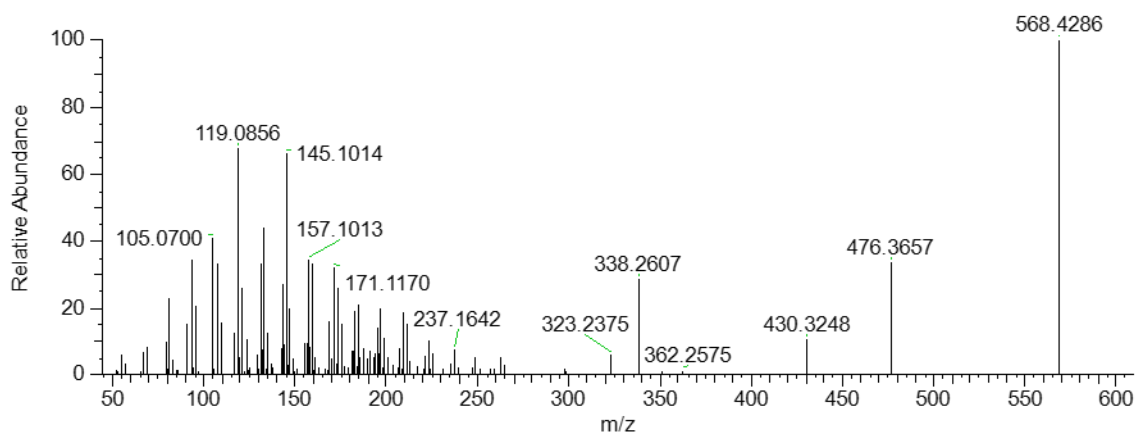
T: FTMS + c ESI d Full ms2 600.4175@hcd30.00 [50.0000-630.0000]



Supplementary Figure S32: Compound M4618 – 568.4279 m/z – $[M]^+$ – $R_t = 7.787$ min – $C_{40}H_{56}O_2$ – Lutein

A551_2 #2577 RT: 10.26 AV: 1 NL: 3.80E+006

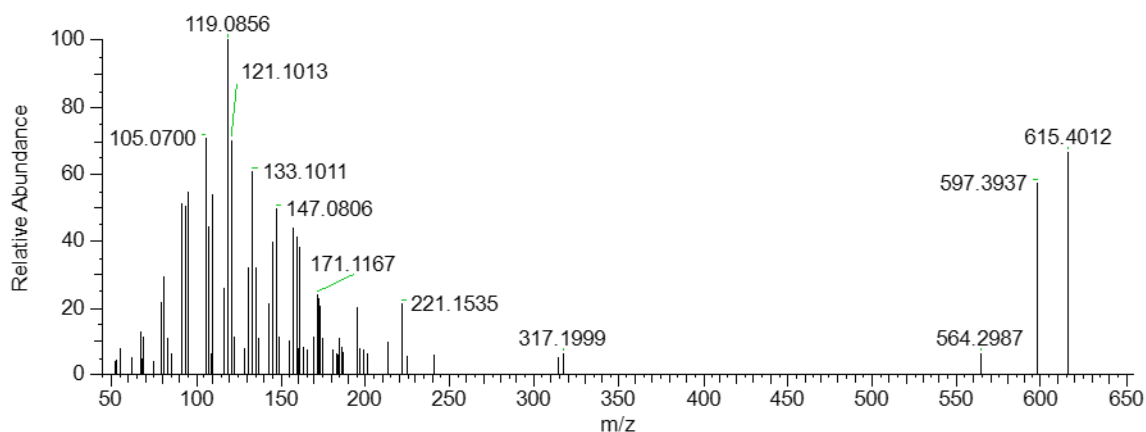
T: FTMS + c ESI d Full ms2 568.4279@hcd30.00 [50.0000-600.0000]



Supplementary Figure S33: Compound M1604 – 615.4047 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 6.539$ min – $C_{40}H_{54}O_5$ – Uriolide

1662_1 #1586 RT: 6.48 AV: 1 NL: 4.44E+004

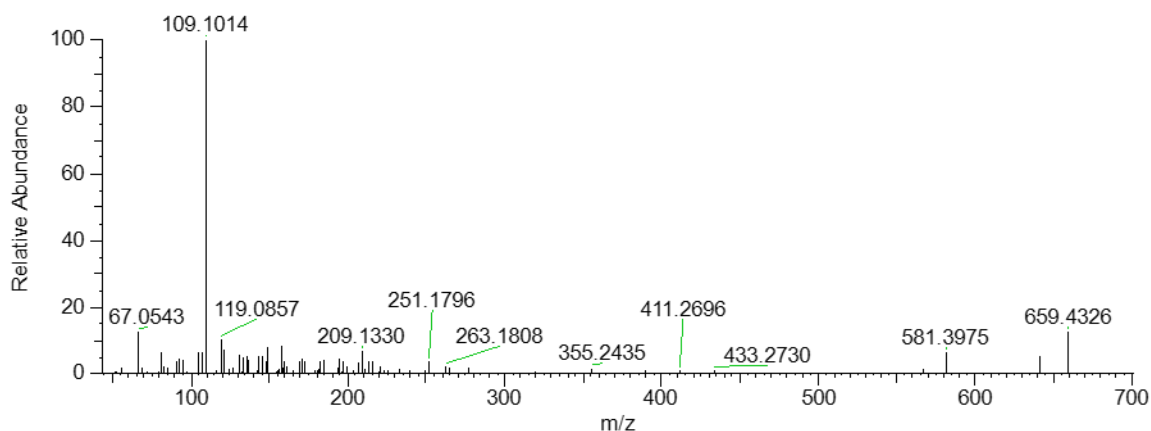
T: FTMS + c ESI d Full ms2 615.4047@hcd30.00 [50.0000-645.0000]



Supplementary Figure S34: Compound M2211 – 659.4307 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 7.391$ min – $C_{42}H_{58}O_6$ – Fucoxanthin. A: MS², B: MS1

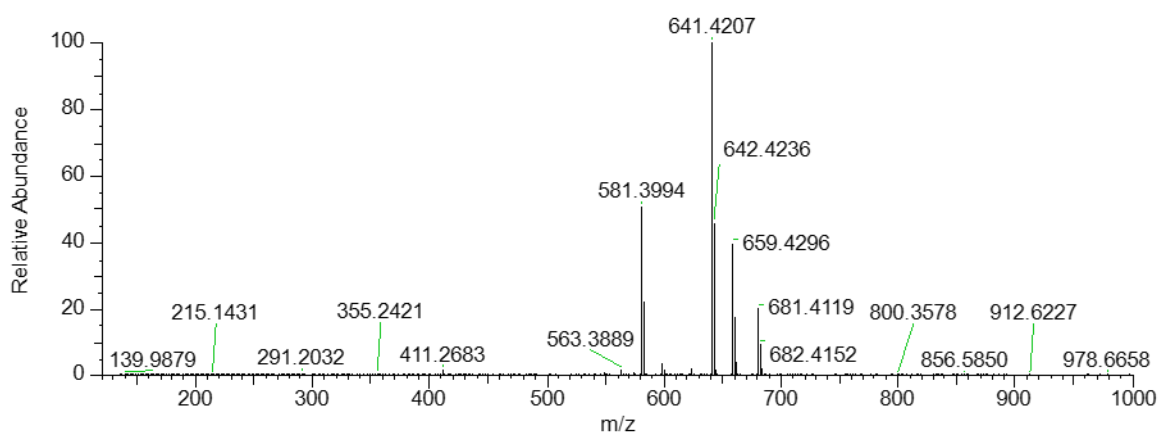
Pav_3 #1778 RT: 7.30 AV: 1 NL: 2.88E+005
T: FTMS + c ESI d Full ms2 659.4308@hcd30.00 [50.0000-690.0000]

A



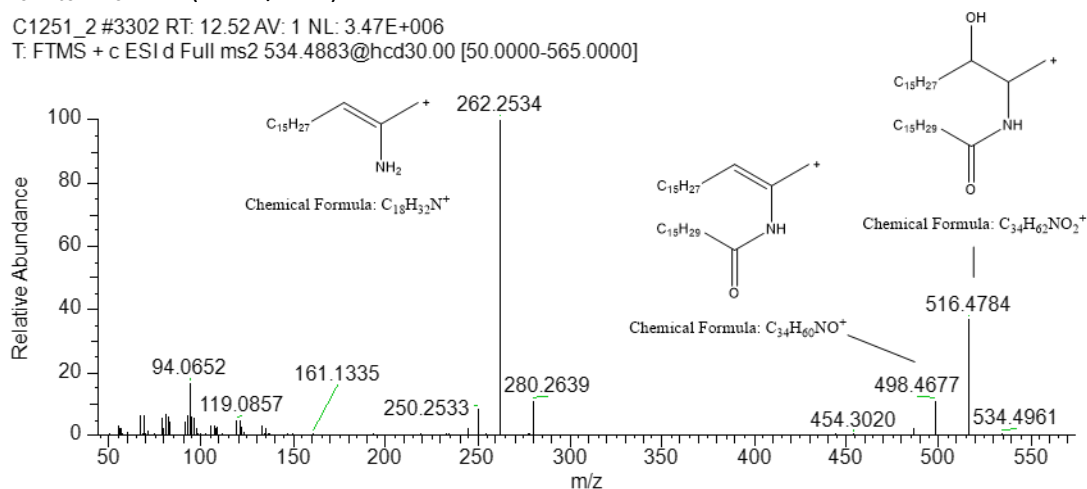
Pav_3 #1807 RT: 7.39 AV: 1 NL: 8.62E+008
T: FTMS + c ESI Full lock ms [133.4000-2000.0000]

B



Supplementary Figure S35: Compound M5935 – 534.4882 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 12.589$ min – $C_{34}H_{63}NO_3$ – Cer(d18:2/16:1)

C1251_2 #3302 RT: 12.52 AV: 1 NL: 3.47E+006
T: FTMS + c ESI d Full ms2 534.4883@hcd30.00 [50.0000-565.0000]

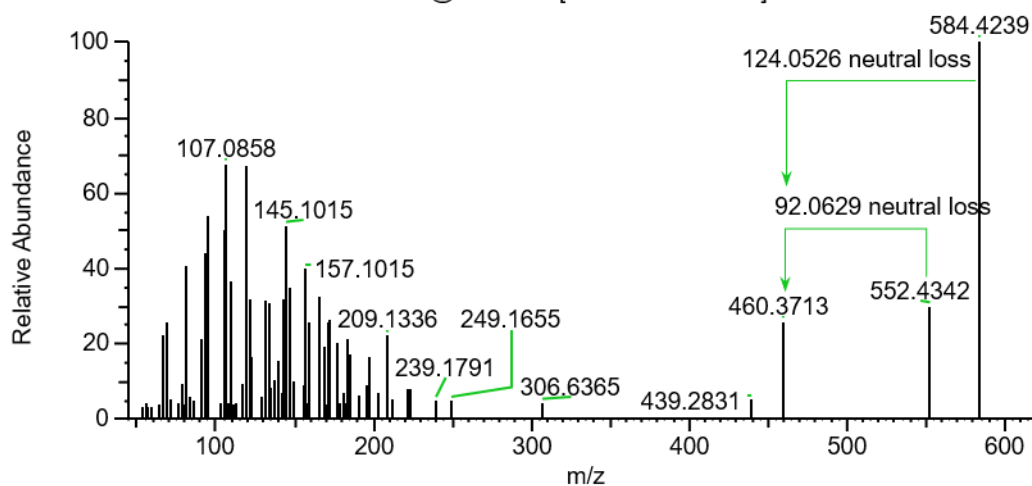


FIGURES SUPPLEMENTAIRES DU CHAPITRE III

Supplementary Figure S1: Compound 19 – 584.423 m/z – $[M]^{++}$ – $R_t = 12.48$ min – $C_{40}H_{56}O_3$ – Epoxycarotenoïde

MA_22_1 #3309 RT: 12.46 AV: 1 NL: 5.38E4

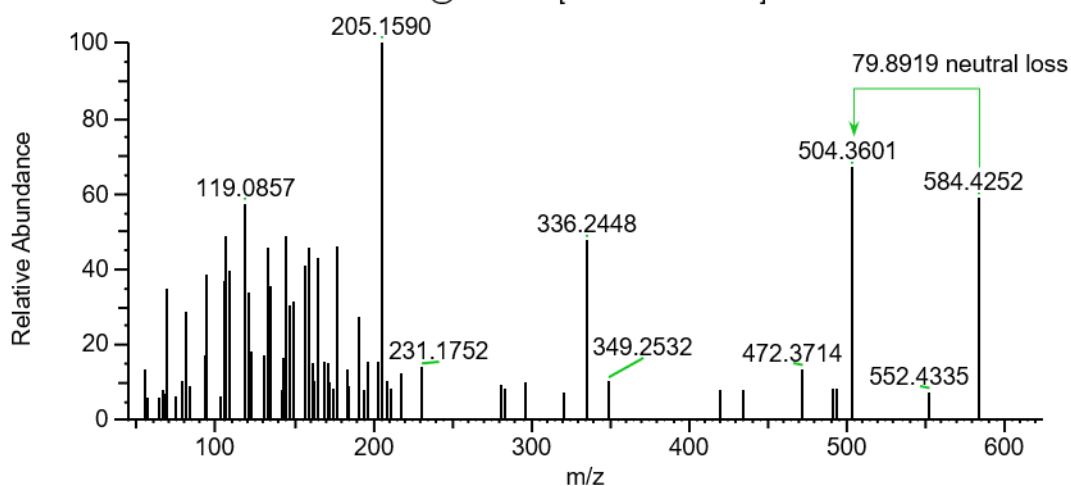
T: FTMS + c ESI d Full ms2 584.4230@hcd30.00 [50.0000-615.0000]



Supplementary Figure S2: Compound 20 – 584.423 m/z – $[M]^{++}$ – $R_t = 14.52$ min – $C_{40}H_{56}O_3$ – Carotenoïde

MA_22_1 #3871 RT: 14.51 AV: 1 NL: 3.01E4

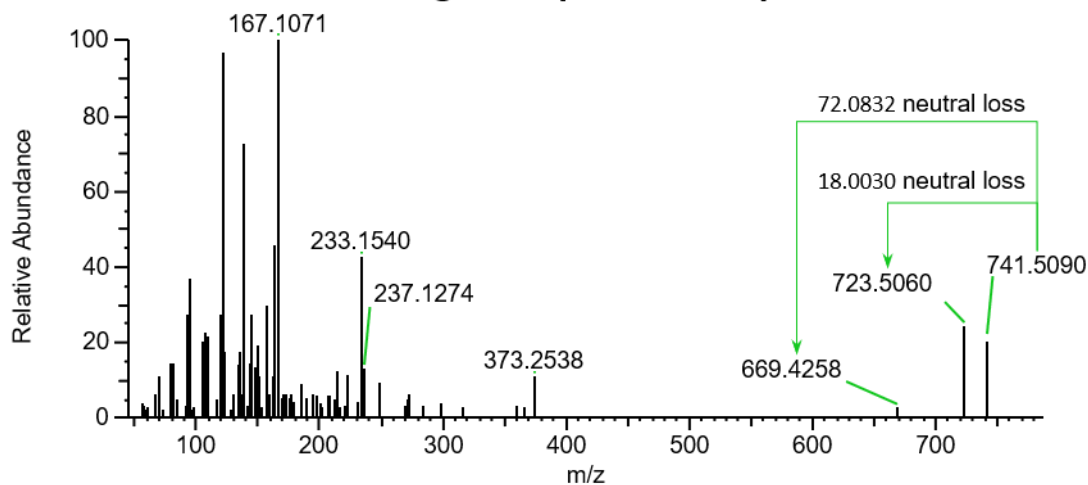
T: FTMS + c ESI d Full ms2 584.4226@hcd30.00 [50.0000-615.0000]



Supplementary Figure S3: Compound **22** – 741.5090 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 15.311$ min – $C_{48}H_{68}O_6$ – Violaxanthine

MA_22_1 #4100 RT: 15.31 AV: 1 NL: 1.41E5

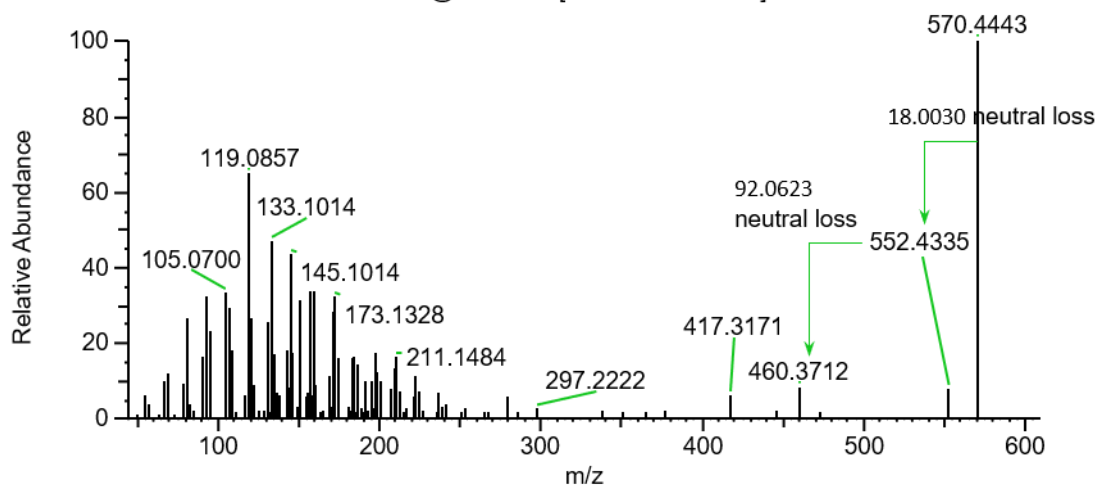
T: FTMS + c ESI d Full ms2 741.5086@hcd30.00 [51.6667-775.0000]



Supplementary Figure S4: Compound **23** – 570.4433 m/z – $[M]^+$ – $R_t = 10.639$ min – $C_{40}H_{58}O_2$ – Carotenoid

2590_10_1 #2801 RT: 10.65 AV: 1 NL: 2.68E6

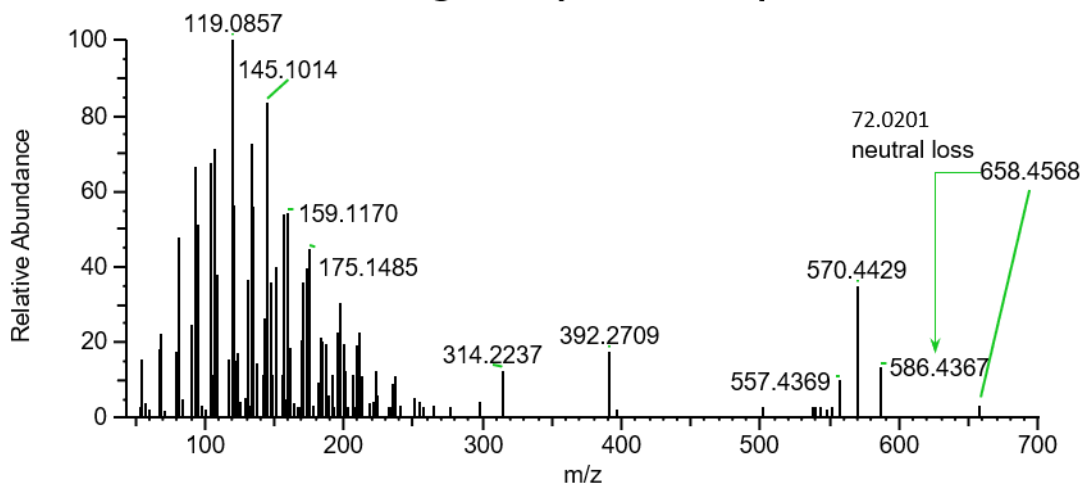
T: FTMS + c ESI d Full ms2 570.4433@hcd30.00 [50.0000-600.0000]



Supplementary Figure S5: Compound **24** – 658.4568 m/z – $[M]^{+}$ – $R_t = 10.76$ min – $C_{40}H_{58}O_3$ – Carotenoid

2590_10_1 #2797 RT: 10.64 AV: 1 NL: 1.27E5

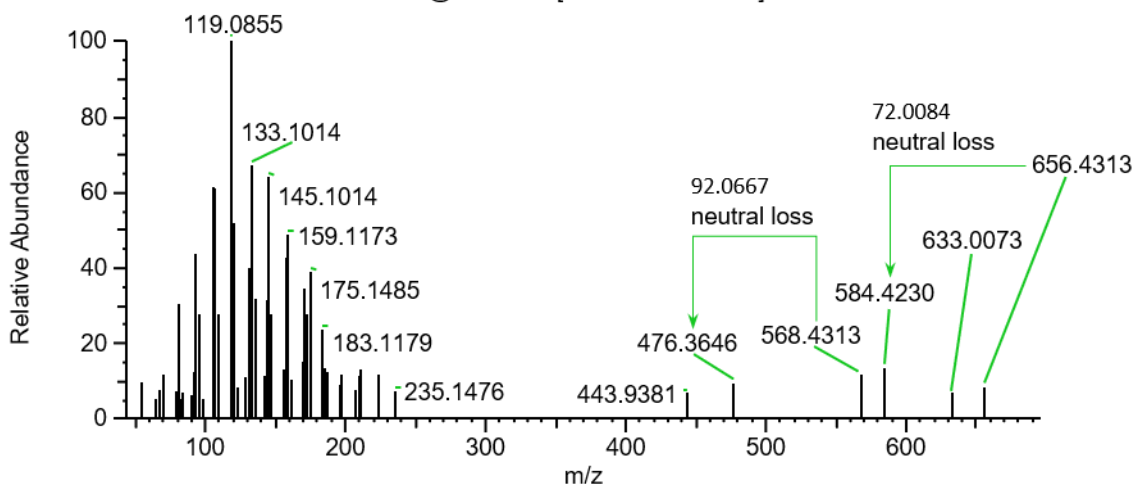
T: FTMS + c ESI d Full ms2 658.4467@hcd30.00 [50.0000-690.0000]



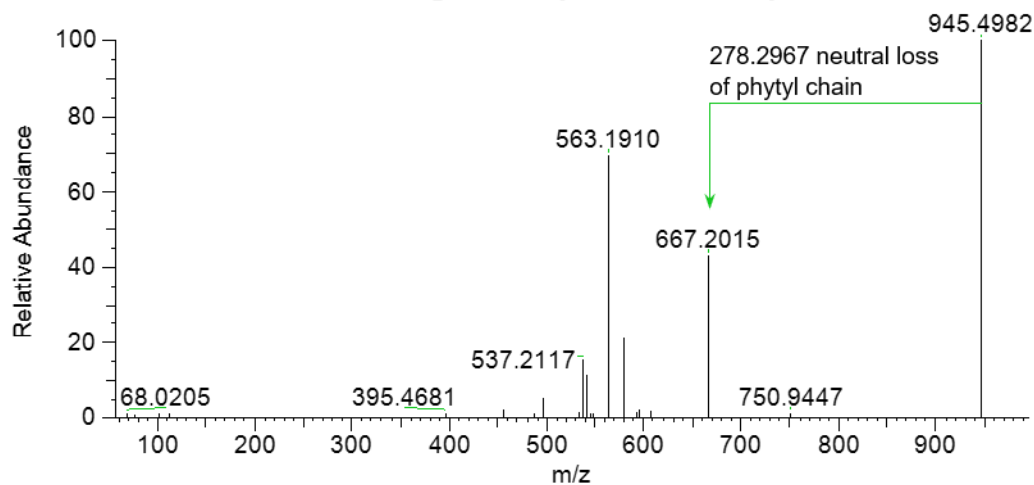
Supplementary Figure S6: Compound **24** – 584.4224 m/z – $[M]^{+}$ – $R_t = 10.761$ min – $C_{40}H_{58}O_2$ – Carotenoid

2590_10_1 #2837 RT: 10.78 AV: 1 NL: 4.56E4

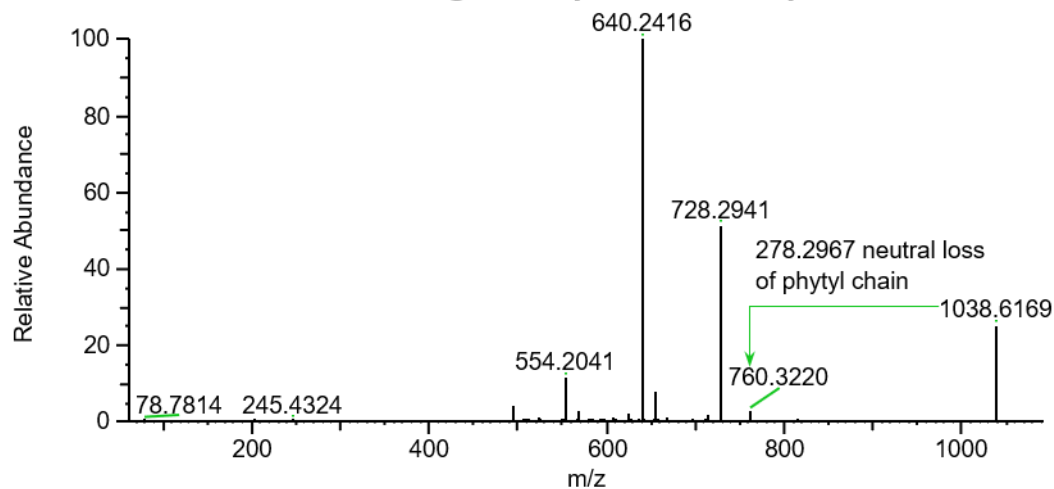
T: FTMS + c ESI d Full ms2 656.4312@hcd30.00 [50.0000-685.0000]



Supplementary Figure S7: Compound **21** – 923.5172 m/z – $[M+H]^+$ – 945.4982 m/z – $[M+Na]^+$ – $R_t = 14.64$ min – $C_{55}H_{70}MgN_4O_7$ – Chlorophyll derivative
MA_22_1 #3859 RT: 14.46 AV: 1 NL: 4.27E5
T: FTMS + c ESI d Full ms2 945.4989@hcd30.00 [65.3333-980.0000]



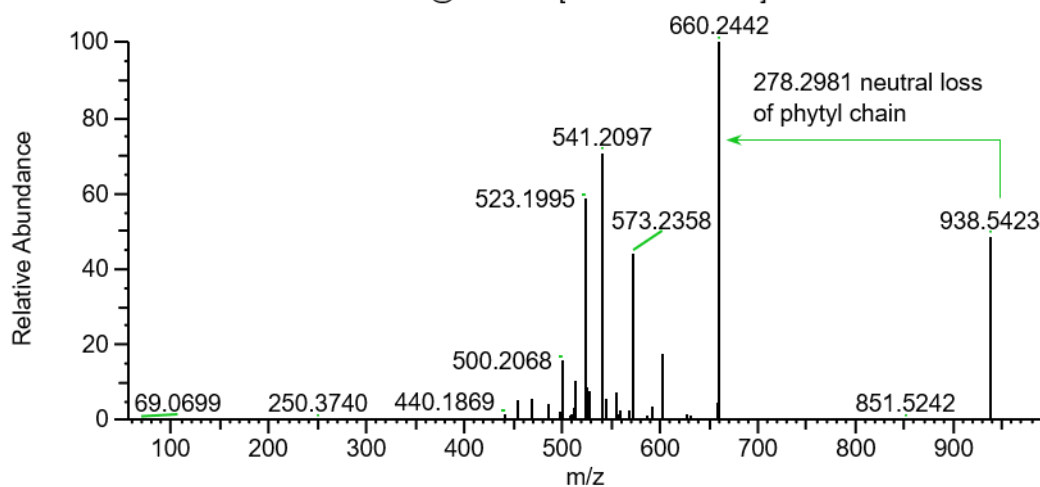
Supplementary Figure S8: Compound **26** – 1038.6170 m/z – $[M]^{2+}$ – $R_t = 11.11$ min – $C_{61}H_{90}N_4O_7Zn$ – Chlorophyll derivative
ML_22_3 #2866 RT: 11.19 AV: 1 NL: 2.80E6
T: FTMS + c ESI d Full ms2 1038.6173@hcd30.00 [71.6667-1075.0000]



Supplementary Figure S9: Compound **30** – 938.5410 m/z – $[M]^{*+}$ – $R_t = 16.04$ min – $C_{56}H_{74}MgN_4O_7$ – Chlorophyll derivative

MA_22_1 #4312 RT: 16.09 AV: 1 NL: 6.91E6

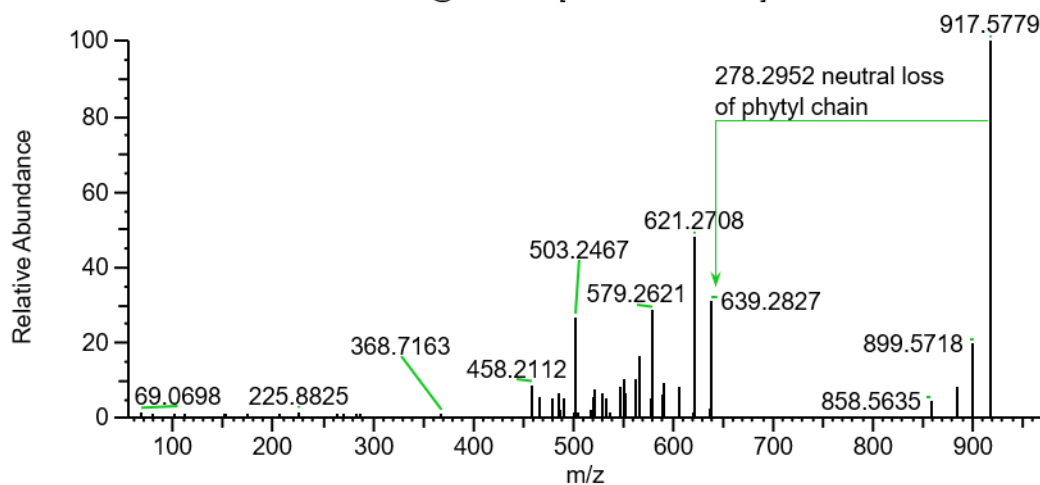
T: FTMS + c ESI d Full ms2 938.5414@hcd30.00 [65.0000-975.0000]



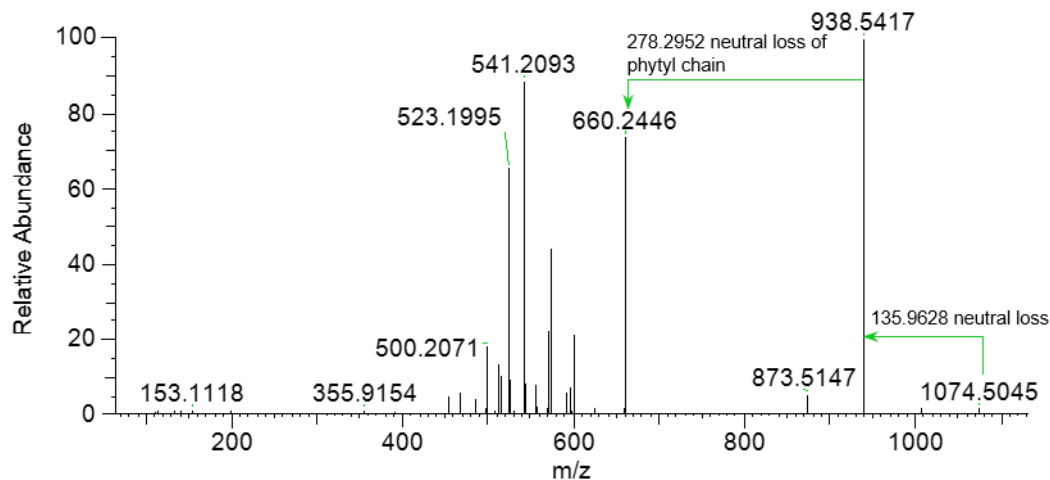
Supplementary Figure S10: Compound **31** – 917.5795 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 16.04$ min – $C_{56}H_{76}N_4O_7$ – Chlorophyll derivative, Pheophytin

MA_22_1 #4336 RT: 16.17 AV: 1 NL: 3.87E5

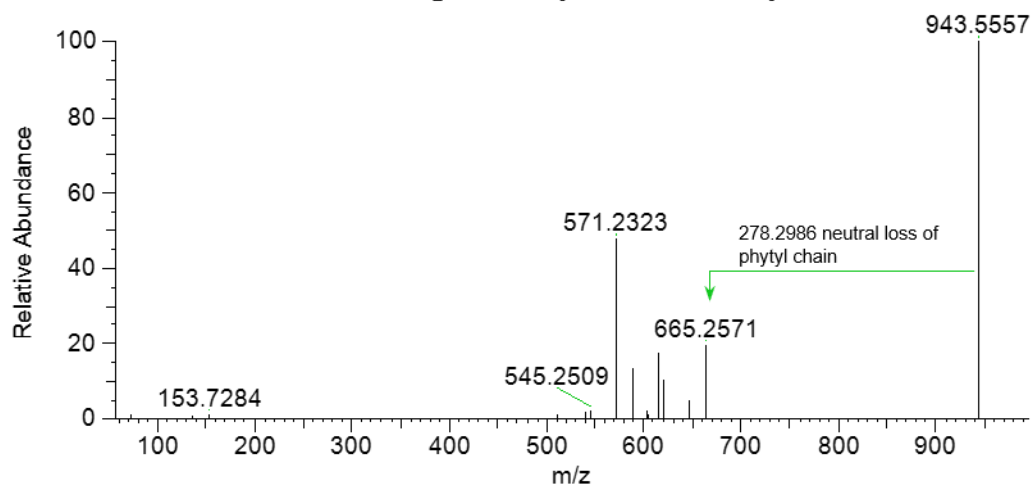
T: FTMS + c ESI d Full ms2 917.5796@hcd30.00 [63.6667-955.0000]



Supplementary Figure S11: Compound **32** – 1074.5140 m/z – $[M]^{++}$ – $R_t = 16.05$ min – $C_{69}H_{70}MgN_4O_6$ – Chlorophyll derivative
MA_22_1 #4306 RT: 16.07 AV: 1 NL: 4.63E5
T: FTMS + c ESI d Full ms2 1074.5142@hcd30.00 [74.3333-1115.0000]



Supplementary Figure S12: Compound **58** – 943.5560 m/z – $[M+Na]^+$ – $R_t = 13.68$ min – $C_{55}H_{76}N_4O_8$ – Chlorophyll derivative, Pheophytin
2590_10_2 #3677 RT: 13.64 AV: 1 NL: 4.72E5
T: FTMS + c ESI d Full ms2 943.5563@hcd30.00 [65.3333-980.0000]

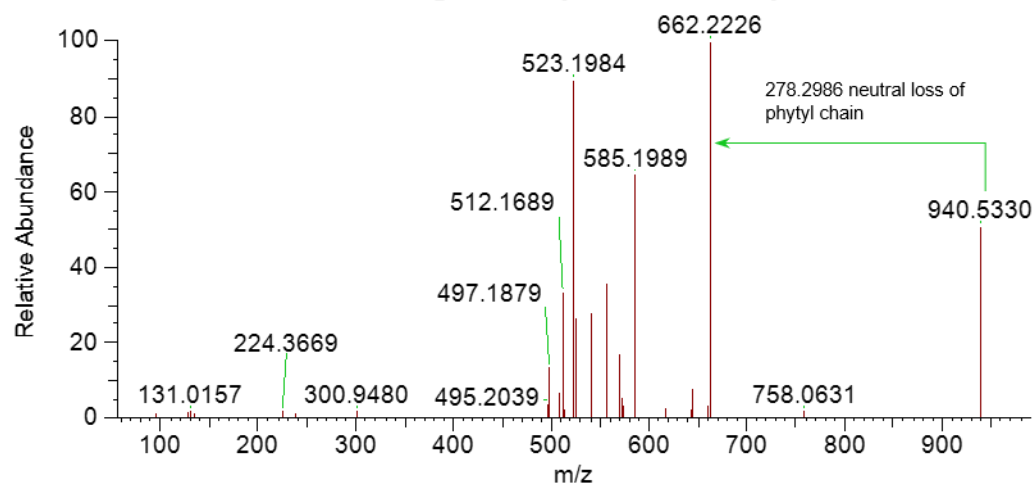


Supplementary Figure S13: Compound **62** – 940.5200 m/z – $[M]^{2+}$ – $R_t = 13.91$ min –

$C_{55}H_{72}MgN_4O_7$ – Chlorophyll derivative

2590_22_3 #3720 RT: 13.89 AV: 1 NL: 3.16E5

T: FTMS + c ESI d Full ms2 940.5191@hcd30.00 [65.0000-975.0000]

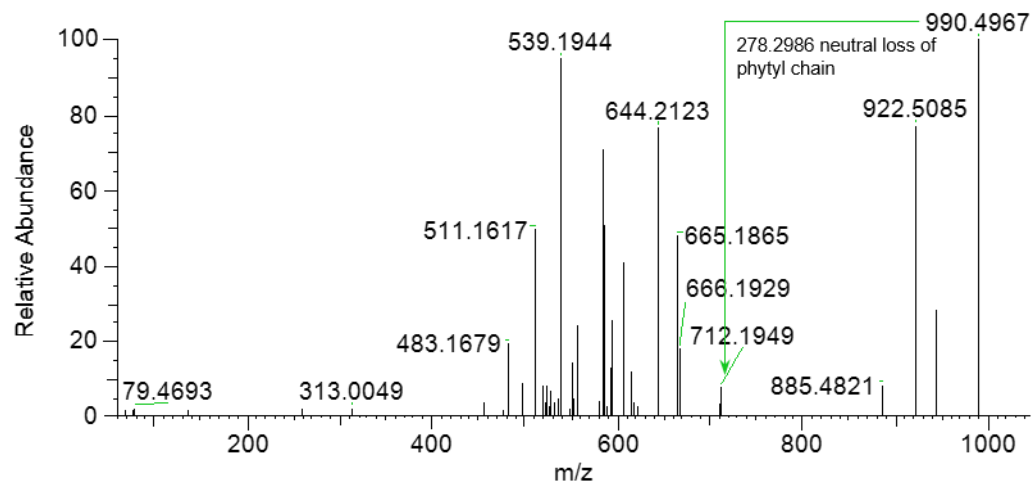


Supplementary Figure S14: Compound **63** – 990.4957 m/z – $[M]^{2+}$ – $R_t = 13.98$ min –

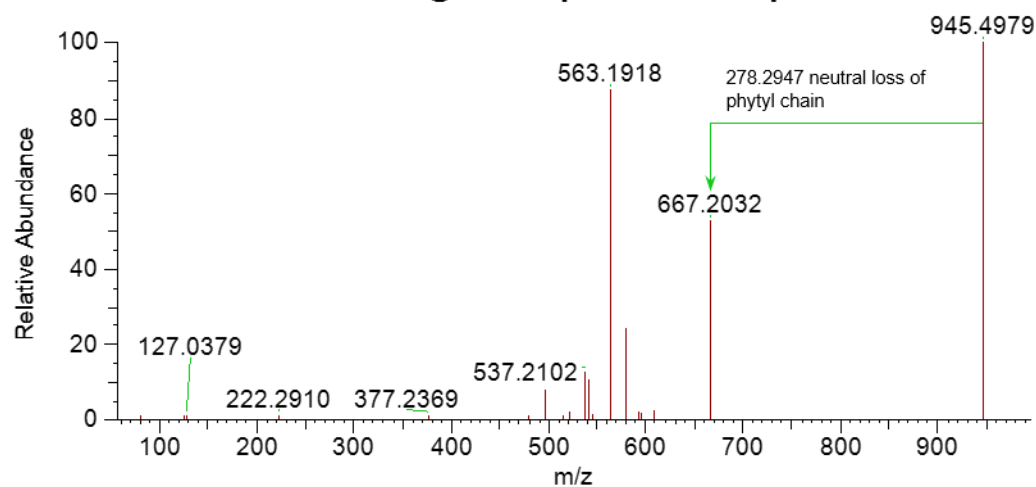
$C_{58}H_{70}MgN_4O_9$ – Chlorophyll derivative

2590_10_1 #3750 RT: 14.00 AV: 1 NL: 2.43E5

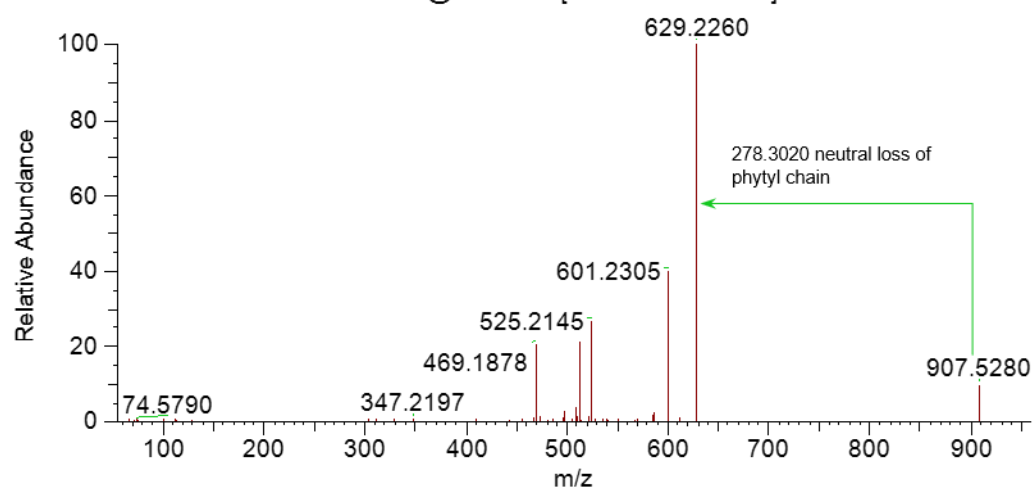
T: FTMS + c ESI d Full ms2 990.4951@hcd30.00 [68.6667-1030.0000]



Supplementary Figure S15: Compound **64** – 945.4986 m/z – $[M+Na]^+$ – $R_t = 14.47$ min – $C_{55}H_{70}MgN_4O_7$ – Chlorophyll derivative
2590_22_3 #3882 RT: 14.46 AV: 1 NL: 3.75E5
T: FTMS + c ESI d Full ms2 945.4987@hcd30.00 [65.3333-980.0000]



Supplementary Figure S16: Compound **66** – 907.5237 m/z – $[M+Na]^+$ – $R_t = 14.95$ min – $C_{53}H_{72}MgN_4O_6$ – Chlorophyll derivative
2590_22_3 #4020 RT: 14.95 AV: 1 NL: 1.69E6
T: FTMS + c ESI d Full ms2 907.5231@hcd30.00 [63.0000-945.0000]

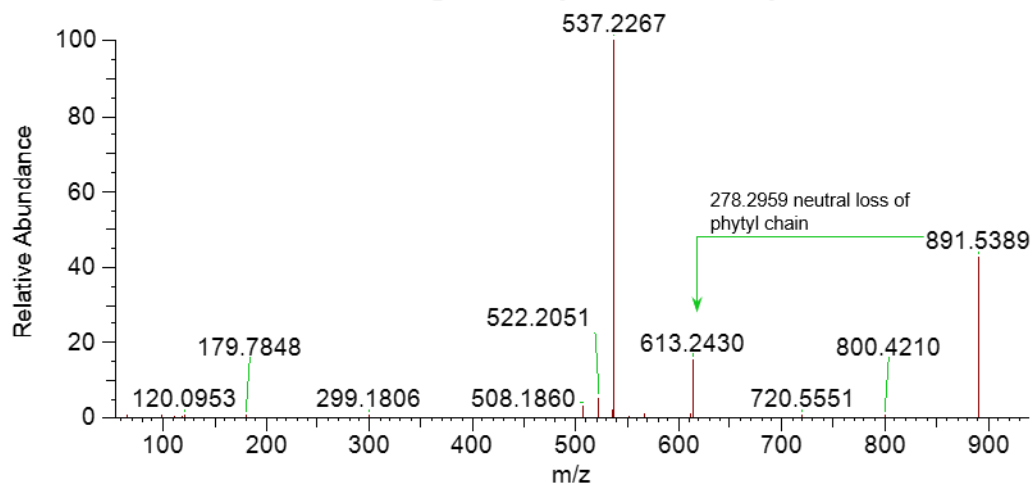


Supplementary Figure S17: Compound **68** – 907.5237 m/z – $[M+Na]^+$ – $R_t = 16.64$ min –

$C_{55}H_{72}N_4O_5$ – Chlorophyll derivative, Pheophytin

2590_10_1 #4484 RT: 16.62 AV: 1 NL: 9.87E5

T: FTMS + c ESI d Full ms2 891.5400@hcd30.00 [61.6667-925.0000]

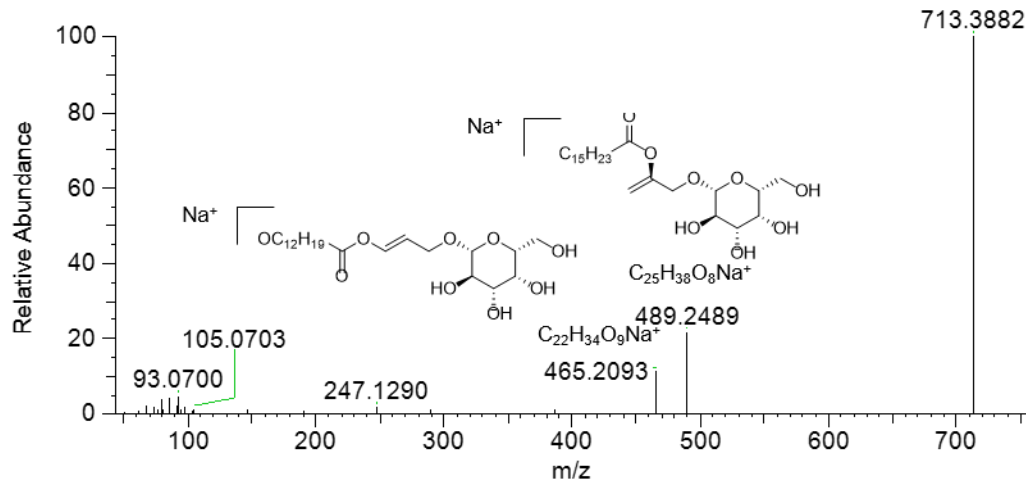
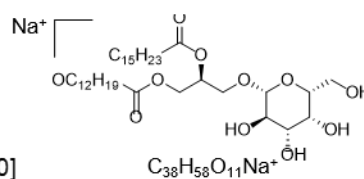


Supplementary Figure S18: Compound **4** – 713.3875 m/z – $[M+Na]^+$ – $R_t = 5.79$ min –

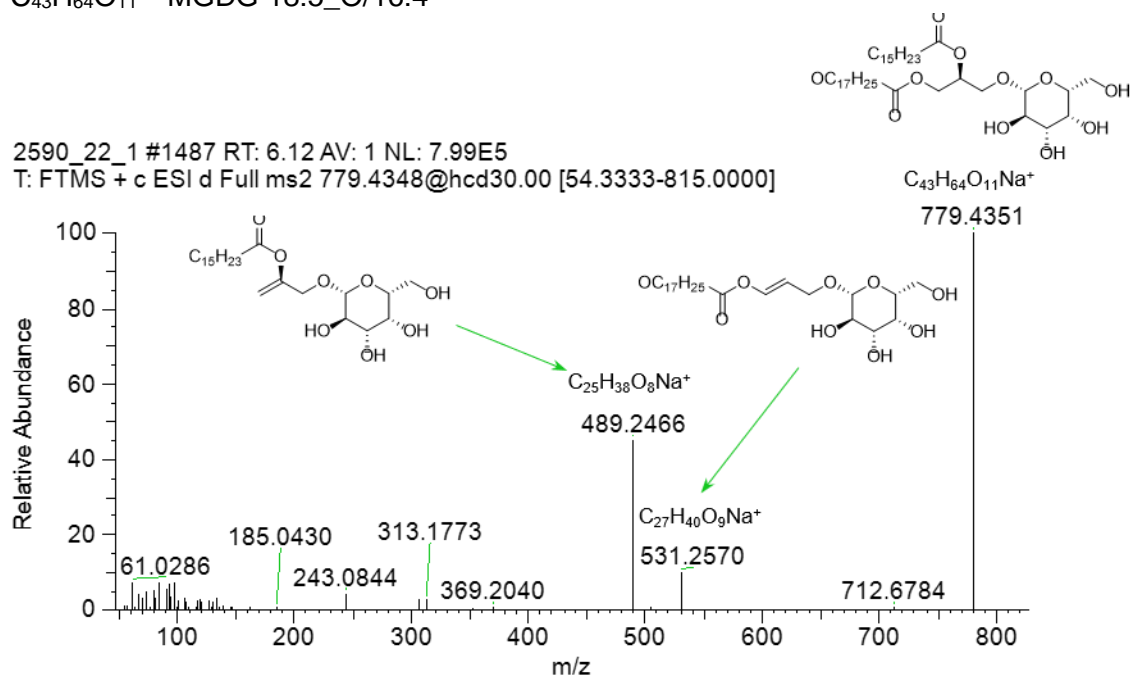
$C_{38}H_{58}O_{11}$ – MGDG 13:3_O/16:4

2590_22_3 #1397 RT: 5.80 AV: 1 NL: 3.35E5

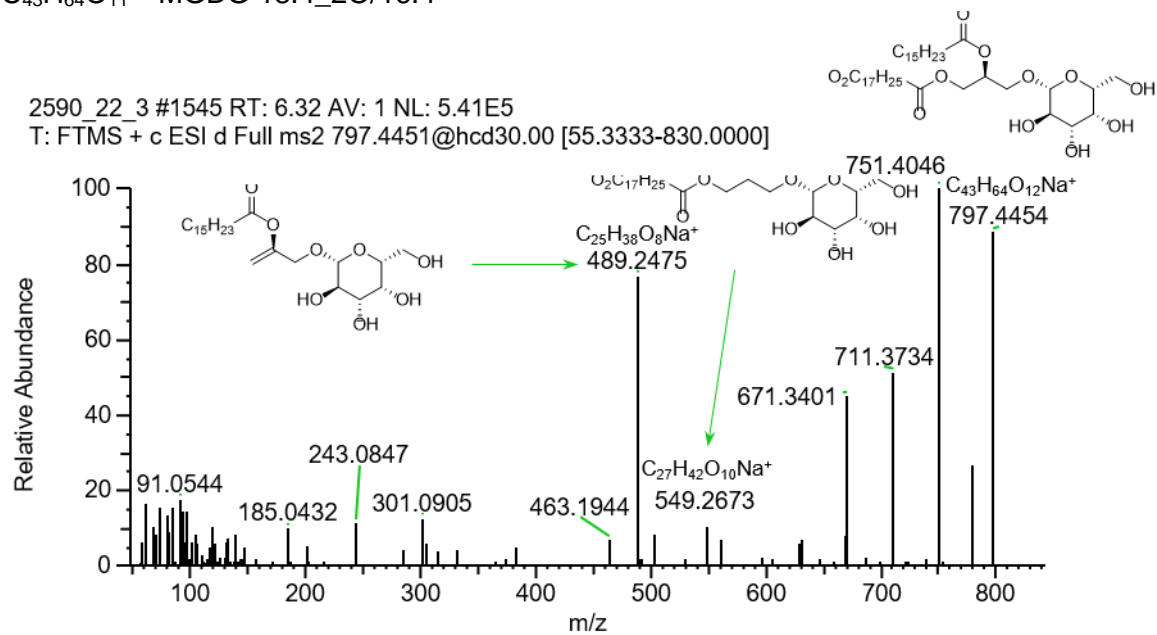
T: FTMS + c ESI d Full ms2 713.3876@hcd30.00 [50.0000-745.0000]



Supplementary Figure S19: Compound **40** – m/z 779.4351 – $[M+Na]^+$ – $R_t = 6.19$ min – $C_{43}H_{64}O_{11}$ – MGDG 18:5_O/16:4



Supplementary Figure S20: Compound **42** – m/z 797.4446 – $[M+Na]^+$ – $R_t = 6.31$ min – $C_{43}H_{64}O_{11}$ – MGDG 18:4_20/16:4

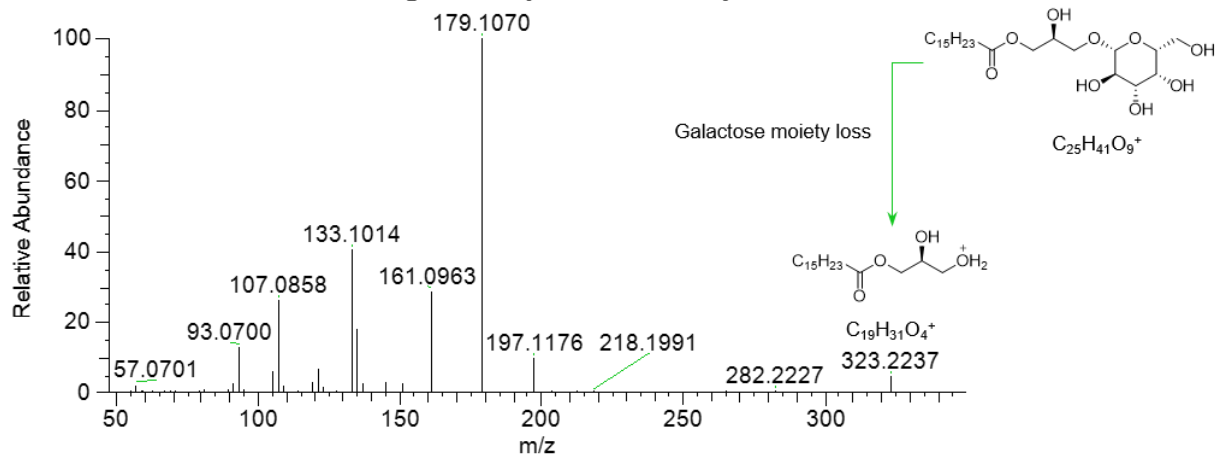


Supplementary Figure S21: Compound 36 – m/z 323.2220 – $[M+H]^+$ – $R_t = 5.84$ min –

$C_{25}H_{40}O_9$ – MGMT 16:4

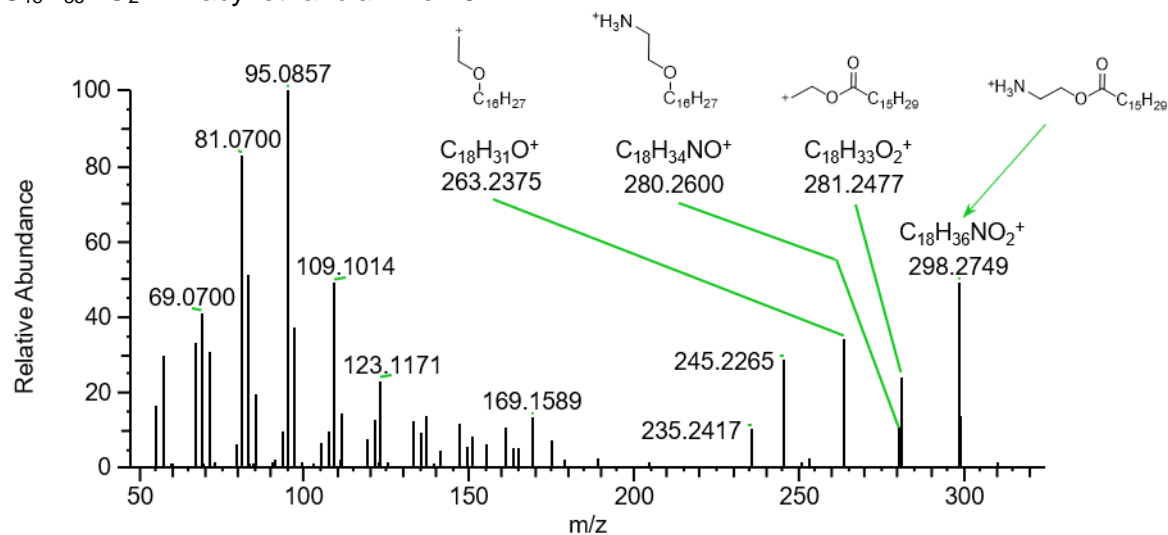
MA_22_1 #1399 RT: 5.84 AV: 1 NL: 2.92E5

T: FTMS + c ESI d Full ms2 323.2219@hcd30.00 [50.0000-345.0000]

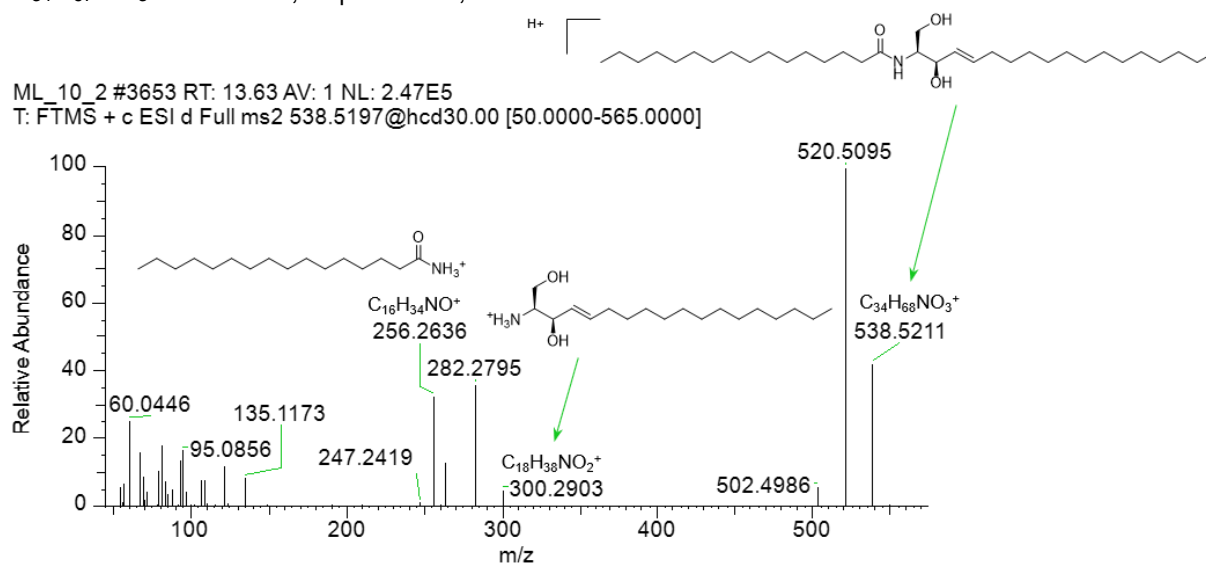


Supplementary Figure S22: Compound 3 – m/z 298.2749 – $[M+H]^+$ – $R_t = 5.50$ min –

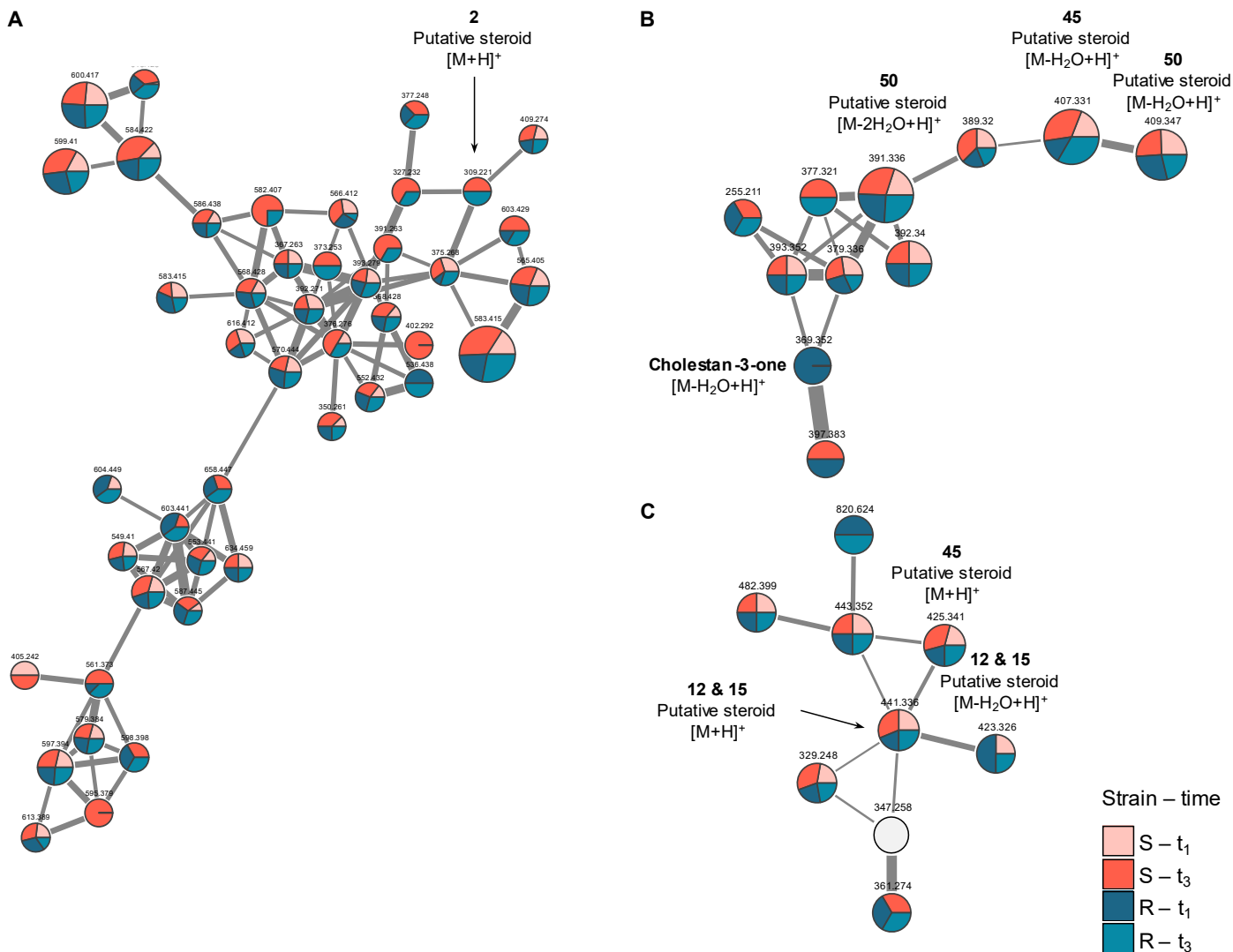
$C_{18}H_{35}NO_2$ – *N*-acyl ethanolamine 16:1



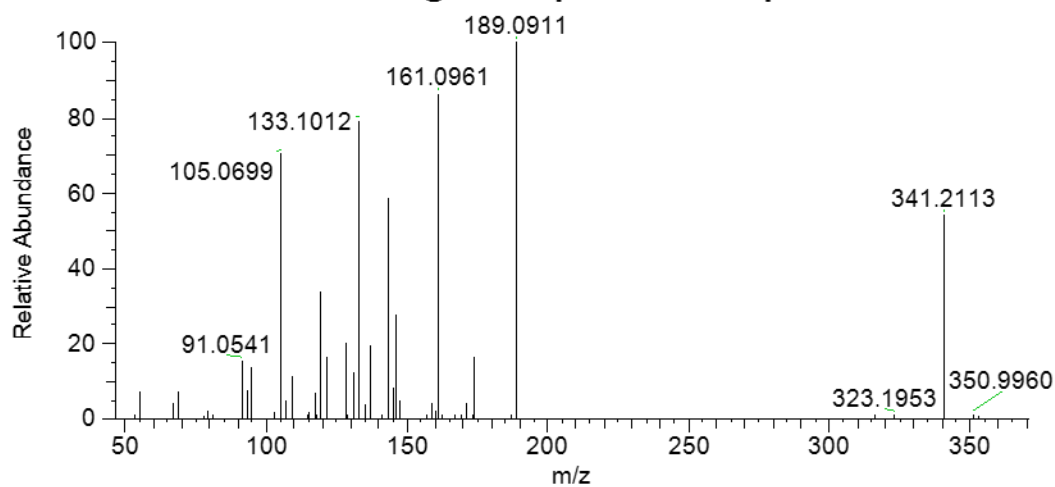
Supplementary Figure S23: Compound **27** – 538.5194 m/z – $[M+H]^+$ – $R_t = 13.67$ min – $C_{34}H_{67}NO_3$ – Cer 34:1;2O|Cer 18:1;2O/16:0



Supplementary Figure S24: GNPS networks of sterol compounds : **A** Putative sterol **2**, **B** Putative sterols **45** and **50** linked in network to pseudomolecular ion m/z 369.3520 whose mass spectrum is matching to $[M-H_2O+H]^+$ adduct mass spectrum of Cholestan-3-on, **C** Putative sterols **12**, **15** and **45**. Pie charts represent mass spectrum intensities for each strain and time point.



Supplementary Figure S25: Compound 1 – m/z 341.2113 – $[M-H_2O+H]^+$ – $R_t = 2.97$ min – $C_{22}H_{30}O_4$ – Putative sterol
 2590_22_3 #647 RT: 2.97 AV: 1 NL: 1.22E5
 T: FTMS + c ESI d Full ms2 341.2111@hcd30.00 [50.0000-365.0000]

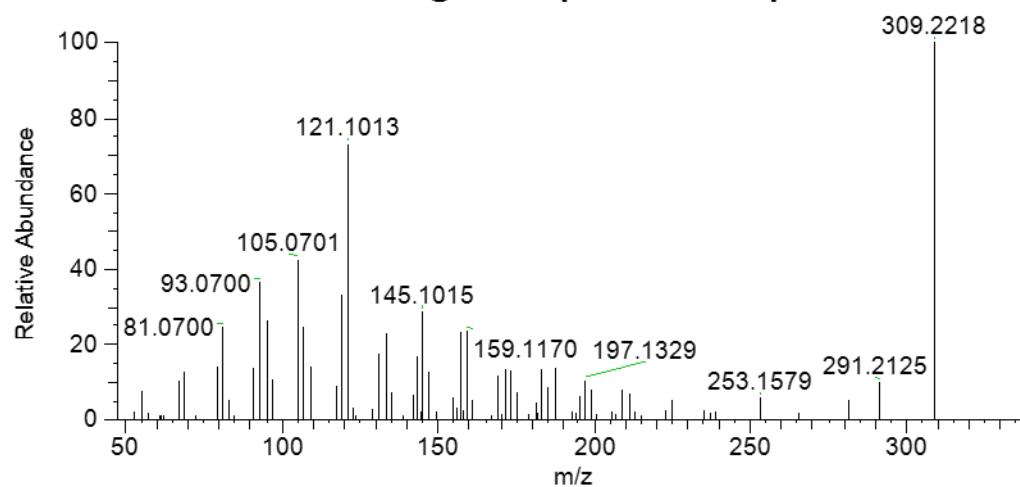


Supplementary Figure S26: Compound 2 – m/z 309.2215 – $[M + H]^+$ – $R_t = 5.25$ min –

$C_{22}H_{28}O$ – Putative sterol

2590_22_3 #1241 RT: 5.25 AV: 1 NL: 8.51E4

T: FTMS + c ESI d Full ms2 309.2214@hcd30.00 [50.0000-335.0000]

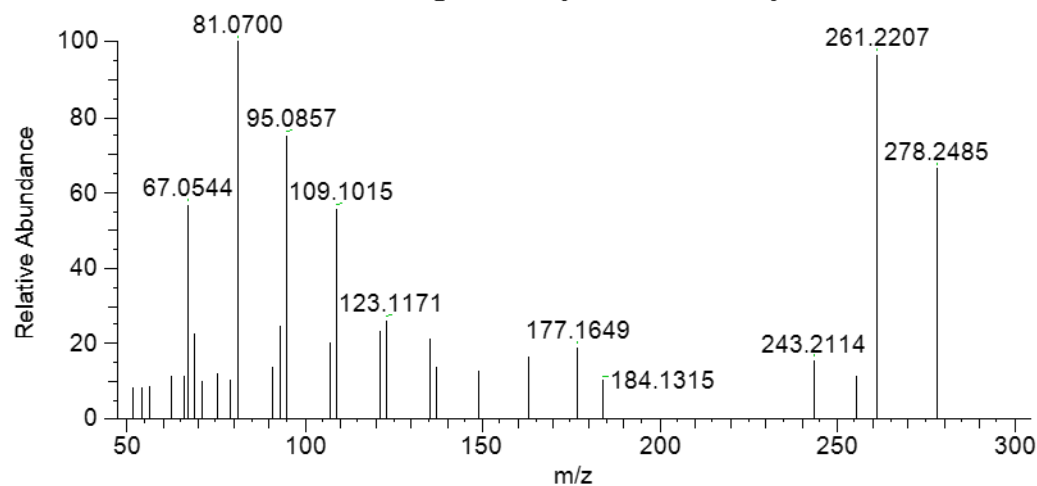


Supplementary Figure S27: Compound 5 – m/z 278.2480 – $[M + NH_4]^+$ – $R_t = 5.81$ min –

$C_{18}H_{28}O$ – Putative sterol

2590_22_3 #1385 RT: 5.76 AV: 1 NL: 3.14E4

T: FTMS + c ESI d Full ms2 278.2481@hcd30.00 [50.0000-300.0000]

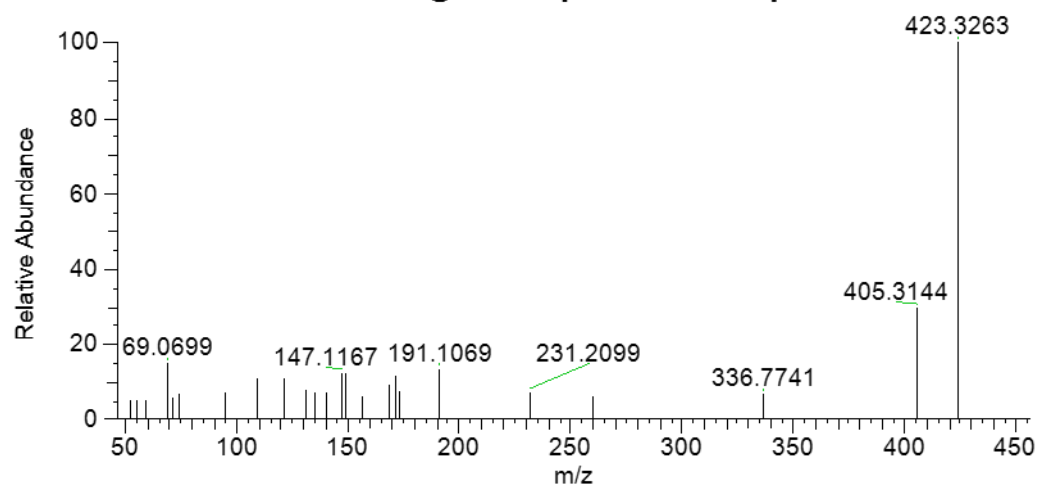


Supplementary Figure S28: Compound **12** – m/z 423.3259 – $[M-H_2O+H]^+$ – $R_t = 7.15$ min –

$C_{29}H_{44}O_3$ – Putative sterol

2590_22_1 #1793 RT: 7.18 AV: 1 NL: 1.08E5

T: FTMS + c ESI d Full ms2 423.3260@hcd30.00 [50.0000-450.0000]

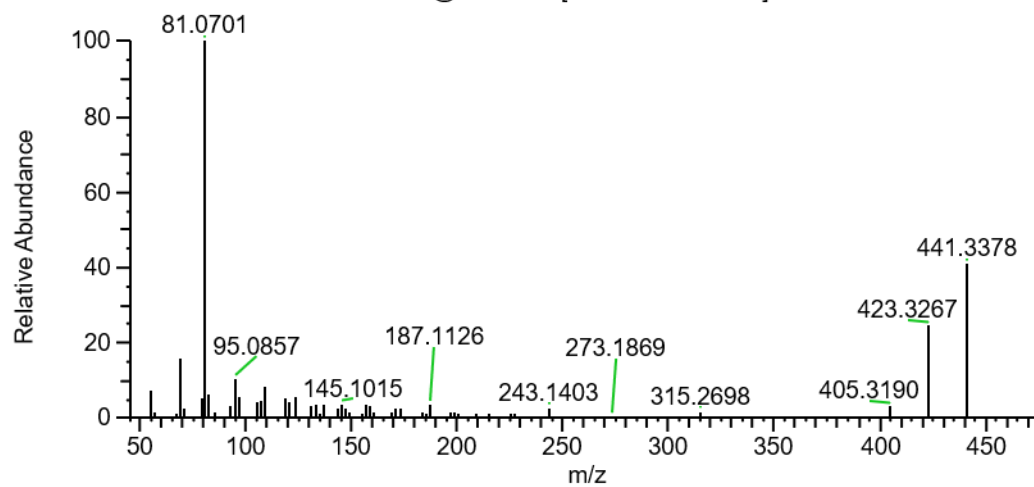


Supplementary Figure S29: Compound **15** – m/z 441.3366 – $[M+H]^+$ – $R_t = 7.31$ min –

$C_{29}H_{44}O_3$ – Putative sterol

MA_22_1 #1783 RT: 7.30 AV: 1 NL: 5.87E5

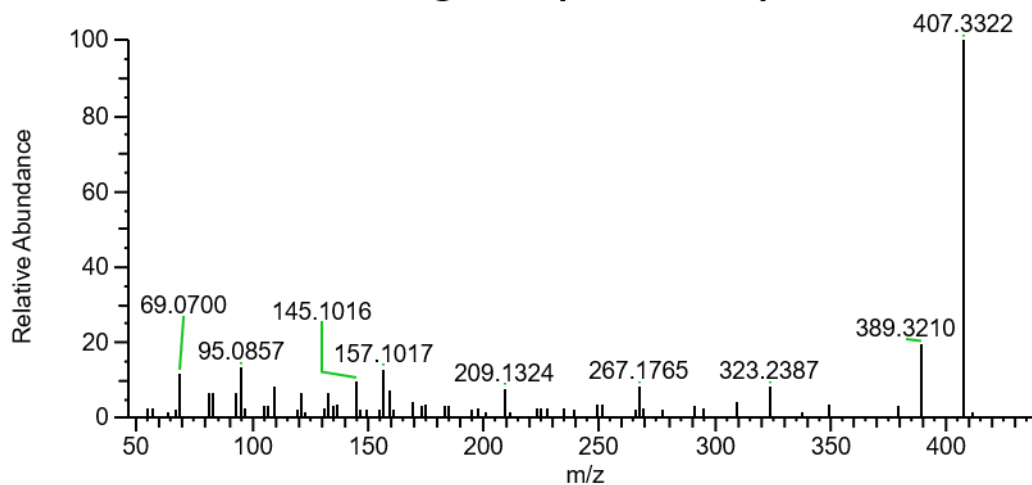
T: FTMS + c ESI d Full ms2 441.3365@hcd30.00 [50.0000-470.0000]



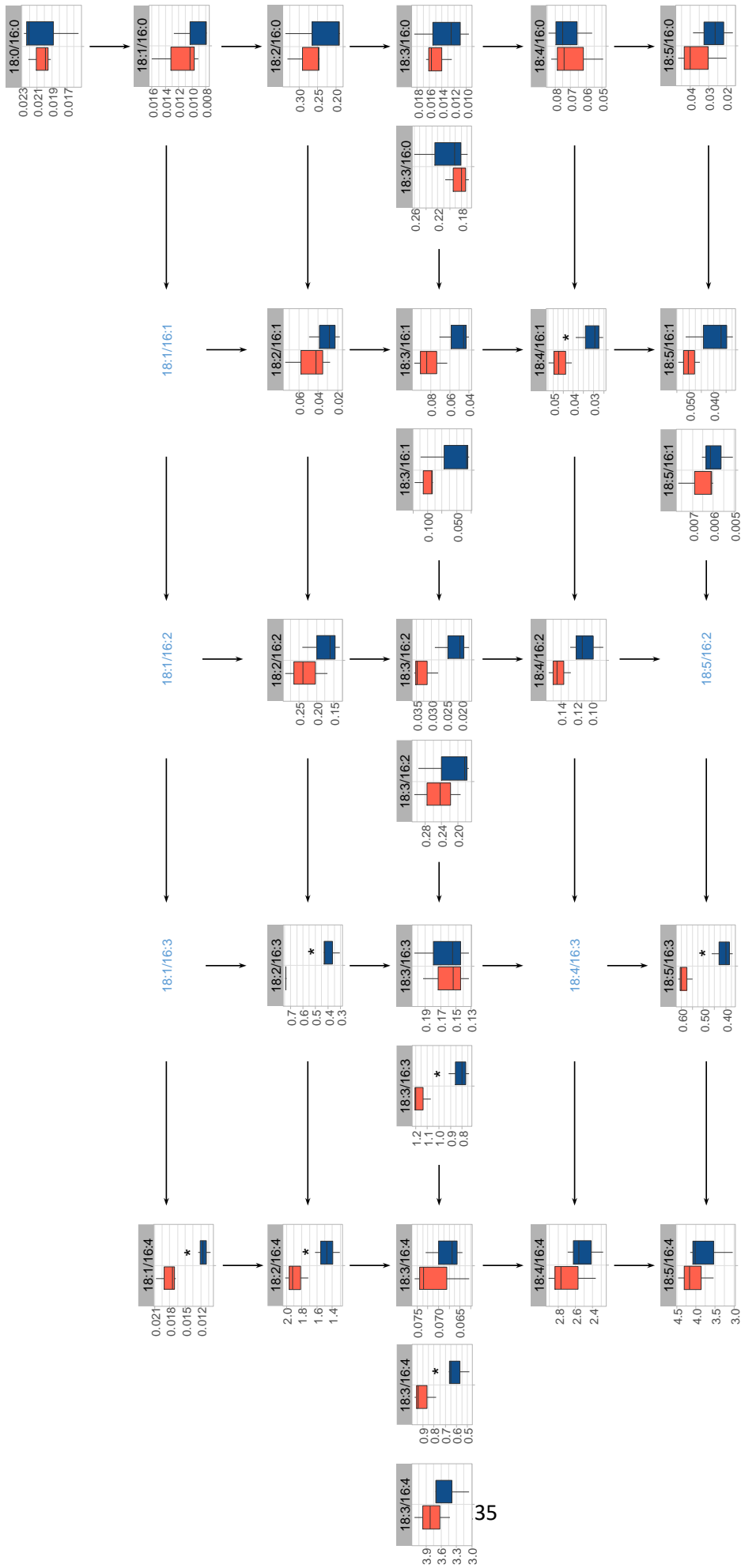
Supplementary Figure S30: Compound **45** – m/z 407.3309 – $[M-H_2O+H]^+$ – $R_t = 6.53$ min – $C_{29}H_{44}O_2$ – Putative sterol

2590_22_1 #1895 RT: 6.53 AV: 1 NL: 7.63E4

T: FTMS + c ESI d Full ms2 407.3310@hcd30.00 [50.0000-435.0000]



Supplementary Figure S31 (page suivante): Monogalactosyl diacylglycerols (MGDGs) abundance between resistant (blue) and susceptible (red) strain of *Ostreococcus mediterraneus*. Arrows indicate the desaturation process under the control of the respective desaturases. * indicates a significant difference in metabolite abundance between strains (Student t-test; $p_{value} < 0.05$).



Supplementary scripts:

Trim Galore

```
--fastqc --stringency 3 --length 25 --trim-n -o Clean --paired $read1  
$read2
```

STAR index

```
STAR --runMode genomeGenerate -genomeDir . -genomeFastaFiles  
O_mediterraneus_genome.fasta --sjdbGTFfile GeneAnnotation.gtf
```

STAR mapping

```
STAR --runMode alignReads --genomeDir $path_to_index --readFilesIn  
$path_to_dir/${i}_end1.fq.gz $path_to_dir/${i}_end2.fq.gz --  
sjdbGTFfile geneAnnotation.gtf --readFilesCommand zcat --  
outFileNamePrefix $path_to_output --outReadsUnmapped Fastx --  
outSAMtype BAM SortedByCoordinate --outSAMstrandField intronMotif --  
outSAMattrIHstart 0 --outFilterType BySJout --quantMode  
TranscriptomeSAM GeneCounts
```

FIGURES SUPPLEMENTAIRES DU CHAPITRE IV

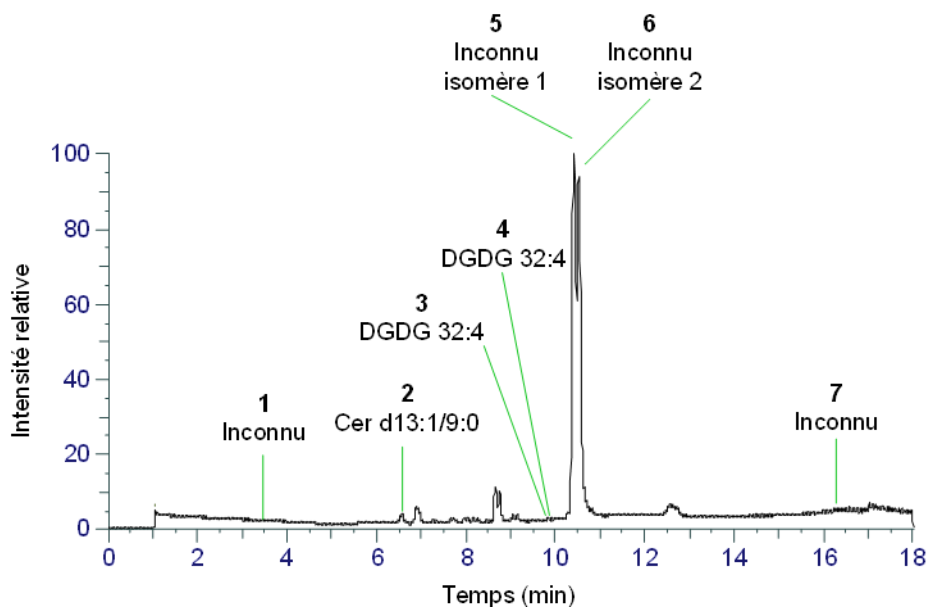


Figure S32. Chromatogramme ionique (TIC) de l'extrait à l'acétate d'éthyle du virus OmV2.

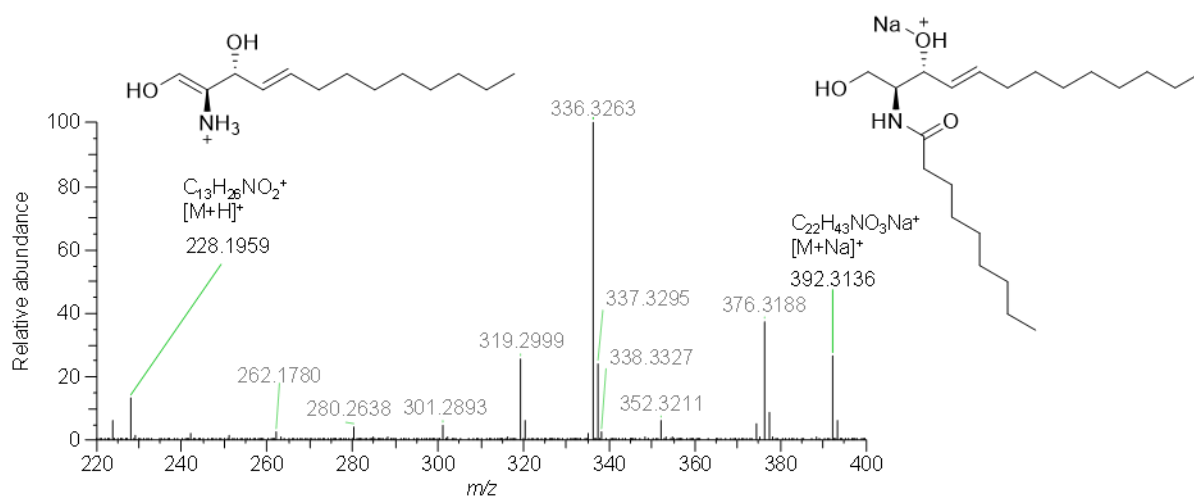


Figure S33. Schéma de fragmentation du céramide d13:1/9:0 du virus OmV2.