



HAL
open science

Rôle des lipides non-phosphorés dans l'architecture des membranes des plantes et des microalgues

Stéphanie Bolik

► **To cite this version:**

Stéphanie Bolik. Rôle des lipides non-phosphorés dans l'architecture des membranes des plantes et des microalgues. Biologie végétale. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV026 . tel-03721007

HAL Id: tel-03721007

<https://theses.hal.science/tel-03721007v1>

Submitted on 12 Jul 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biologie Végétale

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Stéphanie BOLIK

Thèse dirigée par **Juliette JOUHET**
et codirigée par **Bruno DEMÉ**

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

Rôle des lipides non-phosphorés dans l'architecture des membranes des plantes et des microalgues

Role of non-phosphorus lipids in the architecture of plant and microalgae membranes

Thèse soutenue publiquement le **25 mars 2022**,
devant le jury composé de :

Madame Juliette JOUHET

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Alpes, Directrice de thèse

Monsieur Sébastien MONGRAND

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Aquitaine, Rapporteur

Monsieur Bruno DEME

CHARGE DE RECHERCHE HDR, Institut Laue-Langevin, Co-directeur de thèse

Madame Judith PETERS

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes, Présidente

Monsieur Philippe OGER

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne, Examineur

Monsieur Thierry CHARITAT

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Strasbourg, Rapporteur



*A mes parents
et mes sœurs*

Remerciements

Je remercie dans un premier temps Éric Maréchal et François Parcy, directeur et directeur adjoint du laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, et Helmut Schober (récemment remplacé par Paul Langan), directeur de l'Institut Laue Langevin de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs pour la réalisation de mon projet de thèse. Je remercie également Juliette Jouhet, chef du groupe Biogenèse, dynamique et homéostasie des lipides membranaires (ou « Lipids »), et Giovanna Fragneto, chef de groupe Large Scales Structures (LSS) de m'avoir accueillie dans leur équipe.

Je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse qui m'ont fait confiance et soutenue tout au long de ce projet. Juliette Jouhet, qui m'a transmis sa passion pour les lipides et fait découvrir le monde des microalgues, me confortant dans l'idée de poursuivre ma carrière dans la recherche en biologie végétale, et Bruno Demé, qui m'a fait découvrir la physique des neutrons, et qui a su m'expliquer la technique, ce qui n'était pas évident pour une biochimiste. Je les remercie d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit de thèse pour m'aider à l'améliorer.

Je remercie ensuite le jury de thèse qui a accepté d'évaluer mon travail, Sébastien Mongrand, Thierry Charitat, Judith Peters et Philippe Oger. Philippe a également fait partie de mon comité de suivi de thèse avec Frédéric Beisson, apportant tous les deux un regard critique sur mes résultats.

Les prochains remerciements vont aux personnes qui m'ont aidée au cours de ce projet, à commencer par Élodie Billey pour avoir pris le temps de m'expliquer le principe de la recombinaison homologue et de répondre à mes questions. Guillaume Tourcier pour m'avoir transmis la technique de la transformation avec tous les trucs et astuces que cela comprend. Catherine Albrieux et Étienne Deragon pour la culture de plantes ou de microalgues et les nombreuses extractions de lipides qu'ils ont dû faire, Valérie Gros pour avoir analysé les lipides. Alberto Amato pour avoir répondu à mes questions sur les microalgues et de m'avoir expliquée la phylogénie.

Je remercie les personnes de l'équipe Lipids pour les longues discussions scientifiques avec de nombreuses réflexions très intéressantes et enrichissantes : Éric Maréchal, Fabrice Rébeillé, Morgane Michaud, Alberto Amato, Séverine Collin, Denis Falconet, Juliette Salvaing, Olivier Bastien et Sylvaine Roy. C'est l'occasion pour remercier aussi Tiffany Guyonnet et Sophie Mistri d'avoir géré avec brio toute la partie administrative.

Je remercie ensuite toutes les personnes que j'ai rencontrées durant de ma thèse, d'abord des collègues, rapidement devenus des amis. En particulier Guillaume Tourcier, ma plus belle rencontre au cours de ces trois ans et demi. Une personne exceptionnelle qui a su me faire grandir et prendre confiance en moi. Les mots ne suffiront pas pour dire tout ce qu'il m'a apporté. Je retiens aussi tous les bons moments partagés, les petites pauses café puis les repas au soleil, les longues discussions, mon premier match de foot, les soccers, ... merci à toi.

Merci à Grégory Si Larbi « Greg », pour sa bonne humeur, peut être parfois un peu trop, pour les discussions qu'on a eues, et son soutien.

Merci à Nolwenn Guéguen « Nono » et Adeline Stewart, les copines de thèse avec qui nous avons beaucoup rigolé. Merci pour les randonnées, les après-midis crêpes. Merci Nono pour les soirées jeux jusqu'au bout de la nuit à trois avec Mauro (jouer à Pandemic en pleine pandémie, plutôt osé) et les ateliers arts plastiques.

Merci à Benjamin Fel pour les bons moments partagés, et de m'avoir initiée au karaté combat et à la self défense (« la bagarre » comme il dirait). C'est l'occasion de remercier les Perruches pour leurs entraînements, pour les pizzas partagées après le karaté et les parties de jeux de société (Simon et Thibault « Tic et Tac » et Laetitia), et Marlène Bonnanfant de nous avoir rejoint.

Merci aux thésards et copains du bureau, Damien Le Moigne et Sébastien Leterme pour leur bonne humeur et les fous rires (n'oublie pas Damien « qu'on vit vraiment une drôle d'époque »), et aussi les réflexions et questionnements scientifiques échangés.

Merci à Mélanie Léger, Aline Cissé, Cyrielle Métais, également en thèse, qui j'ai rencontrées au cours d'une formation de physique, avec qui nous avons partagé des soirées pizzas, crêpes et raclettes en échangeant sur nos expériences de neutrons.

Merci aux footeux, en particulier Christian Morabito qui m'a invitée à participer, Vincent Nourri et Cécile Maës.

Enfin, mes derniers remerciements vont évidemment à ma famille, mes parents et mes sœurs, Anne-Sophie et Lucie, qui m'ont soutenue et encouragée à distance. Merci à mes parents de m'avoir hébergée avec joie pendant le confinement et toute la période de rédaction de ce manuscrit, et à qui j'ai fait subir mes nombreuses réunions et séminaires.

Table des matières

Introduction générale du projet	1
1 Contexte de l'étude.....	3
2 Les organismes d'étude	5
2.1 Les organismes unicellulaires eucaryotes photosynthétiques : les microalgues	5
2.2 L'organisme eucaryote pluricellulaire photosynthétique : la plante supérieure	8
3 Le phosphate, un nutriment essentiel pour le développement des plantes et des algues	8
Données bibliographiques.....	11
1 De la synthèse des acides gras à celle des glycérolipides chez les organismes photosynthétiques	13
1.1 La synthèse des acides gras et leurs propriétés physiques.....	14
1.1.1 Les acides gras : un rôle majeur dans la structure des membranes	14
1.1.2 Les acides gras : un marqueur de la localisation de la synthèse des lipides chez les organismes photosynthétiques	16
1.2 La synthèse des glycérolipides et leurs propriétés biophysiques	18
1.2.1 Les phospholipides	19
1.2.2 Les galactoglycérolipides.....	21
1.2.3 Les bétaines lipides.....	22
1.2.4 Propriétés physicochimiques des glycérolipides.....	25
2 Méthodes d'analyses des propriétés physicochimiques des glycérolipides	26
2.1 Techniques de visualisation des membranes	27
2.1.1 Technique de microscopie optique, confocale et électronique à transmission	27
2.1.2 Technique de cryo-microscopie électronique.....	28
2.1.3 Microscopie électronique par cryofracture	29
2.1.4 Microscopie à force atomique (AFM).....	30
2.2 Mesure de la température de transition de phase des acides gras	31
2.2.1 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	32
2.3 Résonance magnétique nucléaire à l'état solide (SS-RMN).....	33
2.3.1 Spectroscopie par résonance de spin électronique (ESR)	34
2.3.2 Anisotropie de fluorescence.....	35
2.4 Les membranes : des structures organisées.....	36
2.4.1 Analyses par diffraction de neutrons et rayons X	37

2.4.2	La compressibilité de la membrane	39
2.4.3	Simulations de membranes par dynamique moléculaire	40
Matériels et méthodes		43
1 Organismes d'étude et méthodes de culture		45
1.1 La plante <i>Arabidopsis thaliana</i>		45
1.1.1	La souche Col-0.....	45
1.1.2	Condition de culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
1.2 La diatomée <i>Phaeodactylum tricornutum</i>.....		45
1.2.1	La souche Pt1 8.6.....	45
1.2.2	Milieu de culture ESAW et conditions de culture	45
1.3 L'eustigmatophyte <i>Microchloropsis gaditana</i>		46
1.3.1	La souche CCMP526	46
1.3.2	Milieux de culture F/2 et conditions de culture	46
1.4 La bactérie compétente <i>Escherichia coli</i> DH5α.....		48
1.4.1	La souche de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	48
1.4.2	Milieux de culture de <i>Escherichia coli</i>	48
2 Méthodes de biologie moléculaire		49
2.1 Préparation de l'insert pour la transformation de <i>Microchloropsis gaditana</i>		49
2.1.1	Transformation de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	49
2.1.2	Extraction du plasmide des bactéries.....	49
2.1.3	Linéarisation du plasmide.....	50
2.2 Amplification, séparation et purification de fragments d'ADN		50
2.2.1	Amplification par PCR sur colonies de <i>Microchloropsis gaditana</i>	50
2.2.2	Séparation sur gel d'agarose	51
2.2.2.1	Pour un produit de digestion.....	51
2.2.2.2	Pour une amplification par PCR.....	51
2.2.3	Extraction d'ADN sur gel d'agarose.....	51
2.2.4	Concentration d'ADN par précipitation.....	52
2.3 Séquençage d'un fragment d'ADN		52
3 Transformation des microalgues		53
3.1 Transformation de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> par CRISPR-cas9.....		53
3.2 Transformation de <i>Microchloropsis gaditana</i> par recombinaison homologue.....		53
3.2.1	Les gènes ciblés	53
3.2.2	Le gène de résistance à la zéocine	54
3.2.3	Commande des plasmides.....	55

3.2.4	Protocole de transformation par recombinaison homologue	56
3.2.5	Sélection des transformants par PCR sur colonies	57
4	Méthodes d'analyses biochimiques des lipides	59
4.1	Les lipides synthétiques	59
4.2	Méthode d'extraction de lipides	59
4.2.1	Extraction des lipides d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
4.2.2	Extraction des lipides de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> et <i>Microchloropsis gaditana</i> ...	60
4.3	Séparation des lipides par chromatographie	60
4.4	Extraction des lipides de la silice	61
4.5	Analyse de la composition en acides gras des classes de lipides	61
4.5.1	La méthanolyse des lipides.....	61
4.5.2	Quantification des acides gras méthylés par GC-FID.	62
4.6	Analyse de la pureté et de la composition des lipides par MS type trappe.....	63
5	Méthodes d'analyses physiques des lipides.....	63
5.1	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	63
5.1.1	Formation de vésicules mono-dispersées	63
5.1.2	Cycles de DSC.....	64
5.2	La diffraction de neutrons.....	65
5.2.1	Préparation des échantillons.....	65
5.2.2	Solvants de contraste	65
5.2.3	Contrôle de l'humidité relative dans la chambre.....	66
5.2.3.1	Mise en place de l'échantillon dans la chambre d'humidité.....	66
5.2.3.2	L'humidité relative (RH) dans la chambre	67
5.2.3.3	La pression osmotique III	68
5.2.4	Géométrie et paramètres de l'instrument D16.....	68
5.2.4.1	Pour l'expérience de diffraction de neutrons	68
5.2.4.2	Diffusion aux petits angles (SANS).....	71
5.2.5	Réduction des données	71
5.2.6	Profils de densité de longueur de diffusion des neutrons (NSLD)	72
5.2.6.1	Construction du profil NSLD	72
5.2.6.2	Calculs des épaisseurs de bicouche et de couche d'eau	74
6	Analyse phylogénique l'enzyme de synthèse du DGTS.....	75
6.1	Ensemble de données pour l'analyse phylogénique.....	75
6.2	Alignement des séquences de l'ensemble des données	75
6.3	Construction des arbres phylogénétiques.....	76

6.4 Analyse bayésienne.....	76
Résultats	79
PARTIE 1 : Etudes des lipides des microalgues chez <i>Phaeodactylum</i>	
<i>tricornutum</i> et <i>Microchloropsis gaditana</i>	81
Chapitre 1 : Etude des bêtaines lipides dans les membranes des	
microalgues.....	83
1 Préambule.....	85
2 Résultats préliminaires sur les lipides naturels	86
2.1 Composition en acides gras du DGTS, du DGTA et de la PC.....	86
2.2 Organisation des membranes de bêtaines lipides	87
2.3 Périodicité des membranes	89
3 Résultats de l'étude des membranes de DPPC et de DP-DGTS	92
4 Conclusion.....	132
Chapitre 2 : Etudes des lipides exotiques dans les membranes des	
microalgues.....	135
1 Préambule.....	137
2 Etude de l'organisation de la PC 22:6/22:6 par diffraction de neutrons .	140
2.1 Résultats.....	141
2.2 Discussion et perspectives	142
3 Etude de l'organisation de l'ASQD de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	144
3.1 Résultats.....	146
3.1.1 Organisation lamellaire des membranes.....	146
3.1.2 Epaisseurs de bicouche et de couche d'eau des membranes.....	148
3.1.2.1 Comparaison des expériences à 100 % et 8 % D ₂ O	148
3.1.2.2 Profils NSLD et épaisseurs	150
3.2 Conclusion et perspectives	153
PARTIE 2 : Etudes des lipides des plantes supérieures chez <i>Arabidopsis</i>	
<i>thaliana</i>	157
Chapitre 3 : Comparaison des propriétés biophysiques du PG et du SQDG ..	159
1 Préambule.....	161
2 Résultats de l'étude des membranes de PG et de SQDG	161
Chapitre 4 : Etude de l'architecture de l'enveloppe du chloroplaste chez les	
plantes supérieures en carence de phosphate.....	185

1	Préambule.....	187
2	Résultats	190
2.1	Organisation des membranes	190
2.2	Périodicité des membranes	192
2.3	Epaisseurs des bicouches et des couches d'eau entre membranes	193
2.4	Rigidité des membranes	197
3	Conclusion et perspectives	198
	Discussion générale et perspectives du projet.....	201
1	Rôle des bétaines lipides dans le remplacement de la phosphatidylcholine des membranes des microalgues.....	204
2	Organisation des lipides exotiques des microalgues	207
3	L'interchangeabilité du PG et du SQDG chez <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	208
4	Rôle du DGDG dans la déformation de l'enveloppe du chloroplaste	209
5	Perspectives d'étude des lipides par une approche biochimique	211
	Annexes	213
	Références bibliographiques	225

Abréviations

A

ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
ASQD	Acyl-sulfoquinovosyldiacylglycérol
ATP	Adénosine triphosphate

B

BTA	Betaine lipid synthase
-----	------------------------

C

CCT	CTP:phosphocholine cytidyltransférase
CDP	Cytidine diphosphate
CDP-Cho	CDP-choline
CDP-Etn	CDP-éthanolamine
CDS	CDP-diacylglycérol synthase
CL	Cardiolipine
CLS	Cardiolipine synthase
CPT	CDP-choline:DAG choline phosphotransférase
Cryo-ME	Cryo-microscopie électronique

D

<i>d</i>	Périodicité lamellaire
DAG	Diacylglycérol
<i>d_b</i>	Epaisseur de la membrane
DGAT	Acyl-CoA:DAG acyltransferase
DGCC	1,2-diacylglycéryl-3-O-carboxy-(hydroxyméthyl)-choline
DGD	DGDG synthase
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
DGTA	1,2-diacylglycéryl-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)-β-alanine
DGTS	1,2-diacylglycéryl-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homosérine
DHA	Acide docohexaénoïque
DLPC	1,2-dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPG	Diphosphatidylglycérol (cardiolipine)
DPPC	1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DSFA	Double Saturated Fatty Acid
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
<i>d_w</i>	Epaisseur de la couche d'eau entre les membranes

E

ECT	CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférase
EPA	Acide eicosapentaénoïque

EPT CDP-éthanolamine:DAG éthanolamine phosphotransférase
ESAW Enrichment Solution with Artificial Water
ESR Spectroscopie par résonnance de spin électronique

F

FAMEs Esters méthyliques d'acides gras
FATA Fatty acid thioesterase A/B
FIB-SEM Microscopie électronique à balayage par faisceau d'ions focalisés
FQ Fluorescence quenching

G

GC-FID Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
GPAT (ATS1) Acyl-ACP/glycérol-3-phosphate acyltransférase
GPAT9 Glycérol-3-phosphate acyltransférase

I

IFET Transfert d'énergie de fluorescence intramoléculaire

K

KAS Ketoacyl-ACP synthase
KO Knock Out

L

LB Bouillon de lysogénie
LC-FACS Long chain acyl-CoA synthetase
LPAAT (ATS2) Acyl-ACP/acide lysophosphatique acyltransférase

M

MCMT Malonyl-CoA:ACP acyltransferase
MET Microscopie électronique à transmission
MGD MGDG synthase
MGDG Monogalactosyldiacylglycérol
MS Spectrométrie de masse
MUFA Mono-Unsaturated Fatty Acid

N

NSLD Neutron Scattering Length Density

O

OEM Outer Envelope Membrane

P

PA Acide phosphatidique
PAH Hydrolase phosphatidique

PAP	Acide phosphatidique phosphatase
PC	Phosphatidylcholine
PCho	Phosphocholine
PCR	Amplification en chaine par polymérase
PCT	Phosphatidic acid cytidyl transferase
PDH	Pyruvate dehydrogenase
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEMT	Phosphatidylethanolamine N-transferase
Petn	Phosphoéthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PGS	Phosphatidylglycérol synthase
PI	Phosphatidylinositol
PIS	Phosphatidylinositol synthase
PLPC	1-palmitoyl-2-linoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PMTs	Phosphor-base-N-méthyltransférases
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PS	Phosphatidylsérine
PSII	Photosystème II
PSS	PS synthase
PUFA	Poly-Unsaturated Fatty Acid

R

RE	Réticulum endoplasmique
RH	Relative Humidity

S

SANS	Small angle neutron scattering
SAXS	Small angle X-ray scattering
SFA	Saturated Fatty Acid
<i>sn</i> -X	Numérotation stéréochimique
SQD1/2	SQDG synthases
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
SSFA	Anisotropie de fluorescence à l'état d'équilibre (<i>steady-state</i>)
SS-RMN	Résonance magnétique nucléaire à l'état solide

T

TGD	Transporteur trigalactosyldiacylglycérol
TLC	Thin Layer Chromatography
TRFA	Anisotropie de fluorescence résolue en temps (<i>time-resolved</i>)

U

UDP	Uridine diphosphate
-----	---------------------

W

WT	Wild Type
----	-----------

III	Pression osmotique
-----	--------------------

Introduction générale du projet

1 Contexte de l'étude

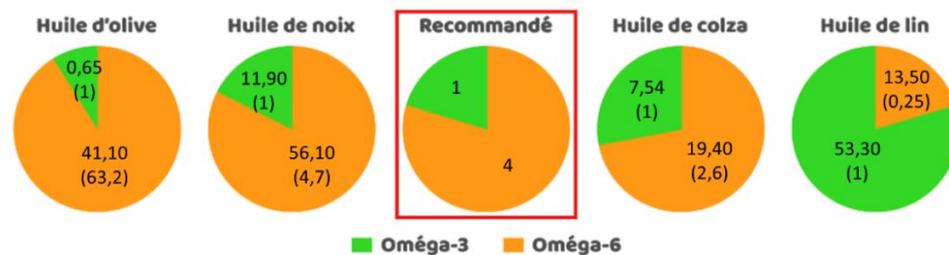
A l'heure actuelle, les grandes industries pétrolières prennent conscience de leur impact sur l'environnement, mais font également face à la raréfaction des énergies fossiles non renouvelables. Progressivement, elles se tournent vers des énergies renouvelables, dites « vertes », plus écologiques, pour limiter la production de CO₂ et d'éléments polluants. Parmi ces énergies, les biocarburants sont au cœur de ce changement. Par définition, d'après le ministère de la transition écologique, les biocarburants sont des carburants de substitution, obtenus par transformation de matières organiques non fossiles de la biomasse (Ministère de la transition écologique, 2021). Trois générations de biocarburants se distinguent en fonction de la source primaire, dont la première génération est plus développée, alors que les deux autres sont toujours en étude. Les biocarburants de première génération sont de deux types : (1) les bioéthanol, produits à partir des végétaux sucriers (canne à sucre, céréales, betterave sucrière) et des résidus viticoles, servant aux moteurs essence, et (2) les biodiesels, produits à partir des sources diverses d'acides gras (huiles végétales - soja, colza, palme -, graisse animale, huiles usagées), servant aux moteurs diesels. En France, 3 % des surfaces agricoles sont utilisées pour la production des bioéthanol, ce qui pose un problème de concurrence alimentaire (Ministère de la transition écologique, 2021).

Pour pallier à cela, les biocarburants issus de la troisième génération sont produits à partir de micro-organismes, comme les microalgues. En plus de ne pas utiliser de champs agricoles, les microalgues offrent de nombreux avantages : une croissance rapide avec un dédoublement de la biomasse en 24 h, et elles peuvent être utilisées pour la fabrication des biodiesels (acides gras), des bioéthanol (sucres) et des biogaz par méthanisation (Connaissance des énergies, 2013). Sur un hectare, un champs de maïs produit 172 L d'huile, alors que les microalgues seraient capable d'en produire entre 58 000 à 136 000 L (Chisti, 2007). En effet, la quantité d'huile dans les microalgues représente en moyenne entre 20 et 50 % de leur biomasse (Chisti, 2007; Spolaore et al., 2006), mais peut atteindre 70 à 90 % du poids sec dans certaines conditions (Bellou et al., 2014; Metting, 1996). En revanche, pour extraire les lipides des microalgues, il est nécessaire de les déshydrater, ce qui est un inconvénient majeur pour l'industrie en termes de coût.

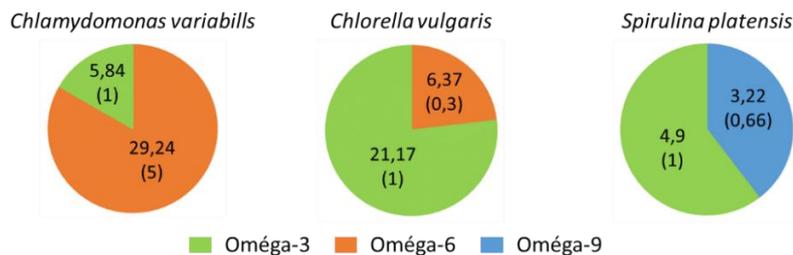
En plus de la production de lipides pour les biocarburants, les microalgues offrent un intérêt dans d'autres domaines. On note en effet la présence d'acides gras polyinsaturés oméga-3 et oméga-6 (ω 3- et ω 6-PUFA) dont elles sont les principaux fournisseurs, permettant le maintien de la chaîne alimentaire (Jónasdóttir, 2019). Chez l'homme, la synthèse des ω 3-PUFA est limitée. Il utilise donc les acides gras de son alimentation comme source d'énergie mais également pour sa santé. Par exemple, l'acide arachidonique (20:4) a un rôle structural dans le cerveau (Calder, 2015). Des études ont montré

que le ratio ω_6/ω_3 était important pour limiter les risques de maladies chroniques. Un ratio ω_6/ω_3 de 4/1 serait optimal (Simopoulos, 2002). Jusqu'à présent, seule une consommation de poissons ou d'huiles végétales pouvait apporter ces acides gras essentiels (Figure 1). Mais en réalité, les poissons se nourrissant de microalgues, ils intègrent les acides gras ω_3 et ω_6 des microalgues dans leur organisme. Ainsi, en utilisant directement la source primaire pour l'alimentation, la pisciculture peut être réduite, réduisant également l'impact sur l'environnement. Par exemple, les microalgues brunes *Phaeodactylum tricornutum* et *Microchloropsis gaditana* sont également riches en acides gras ω_3 , en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5), avec une teneur respectivement de 30 et 20 % molaire d'acide gras (Jouhet et al., 2017). Par ingénierie génétique, il est possible d'augmenter la teneur en acides gras ω_3 de la cellule. Par exemple, une étude montre qu'il est possible d'augmenter jusqu'à 10 % la teneur en acide docohexaénoïque (DHA, 22:6), un acide gras ω_3 également (Hamilton et al., 2015).

Enfin, les microalgues sont responsables d'environ 40 % de la production primaire marine, c'est-à-dire de l'intégration du carbone atmosphérique dans la biomasse lors de la photosynthèse (Falkowski, 1998; Scala and Bowler, 2001). Ceci les rend donc intéressantes dans la réduction des gaz à effet de serre, en utilisant le CO_2 relargué par les usines, nécessaire à leur croissance par exemple.



D'après le site internet : <https://alimentation-et-nutrition.fr/ratio-omega-3-omega-6-aliments/>
Valeurs exprimées en mg/100g.



D'après Abdo et al. (2015)
Valeurs exprimées en pourcentage masse/masse.

Figure 1. Proportion d'acides gras ω_3 et ω_6 dans différentes huiles végétales et certaines microalgues. Les nombres entre parenthèses indiquent le ratio ω_3/ω_6 dans les organismes, le ratio recommandé étant 1/4. *Chlamydomonas variabills* et *Chlorella vulgaris* sont deux microalgues vertes, respectivement riche en ω_6 et en ω_3 . La cyanobactérie *Spirulina platensis* contient aussi des ω_9 en plus des ω_3 .

Ainsi, les microalgues sont une ressource très intéressante qui touche plusieurs domaines, et qui semblent être un bon substitut pour le carburant pétrolier. Le terme « microalgue » regroupe plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces, un nombre possiblement sous-estimé, et seulement 47 000 espèces sont décrites (Andersen et al., 1998; Sharma and Rai, 2011), et leur métabolisme est encore inconnu à l'heure actuelle. La compréhension du métabolisme de ces organismes est donc primordiale pour connaître d'une part, d'un point de vue général, leur développement, les conditions de culture, leur réponse aux stress extérieurs, et d'autre part, d'un point de vue plus précis, les gènes et les protéines impliqués dans la synthèse de lipides, permettant d'avoir les leviers nécessaires pour accroître la production d'huile et améliorer les rendements de fabrication de biocarburant.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la recherche fondamentale, où la compréhension de l'architecture des membranes des microalgues, et plus précisément de l'organisation des lipides dans ces membranes est étudiée. Le métabolisme des lipides chez ces micro-organismes n'est pas entièrement connu, et seules des analogies avec *Arabidopsis thaliana*, l'angiosperme modèle en biologie, ou d'autres microalgues, permettent de prédire les voies de synthèse.

2 Les organismes d'étude

2.1 Les organismes unicellulaires eucaryotes photosynthétiques : les microalgues

Le terme de microalgue est assez difficile à définir précisément et donne souvent lieu à des désaccords. De manière générale, les scientifiques désignent par microalgues, des micro-organismes eucaryotes unicellulaires photosynthétiques, les écartant ainsi des bactéries (non photosynthétiques et procaryotes) et des cyanobactéries (photosynthétiques et procaryotes). Les microalgues proviennent d'une origine évolutive particulière, appelée endosymbiose (*Figure 2*). Ce terme traduit le fait qu'un organisme phagocyte sans dégradation un autre organisme, et que l'hôte conserve une partie des organites de l'endosymbiote pour lui apporter un avantage dans son développement. C'est également ce processus qui a été décrit pour comprendre l'origine de la présence des mitochondries et des chloroplastes dans les cellules végétales (Zimorski et al., 2014).

Un premier évènement d'endosymbiose a lieu entre une cyanobactérie et un eucaryote hétérotrophique inconnu. La cyanobactérie est capable de réaliser la photosynthèse grâce aux thylakoïdes présents à l'intérieur de ses deux membranes. Une fois ingérée par l'hôte, la structure de la cyanobactérie est conservée sous forme de chloroplaste primaire délimité par deux membranes,

permettant à l'eucaryote phagocytaire de réaliser à son tour la photosynthèse. Trois lignées majeures émergent de cette première endosymbiose, basées sur la composition en pigments dans la machinerie photosynthétique (Archibald and Keeling, 2002). La lignée des algues vertes, comme *Chlamydomonas reinhardtii*, est composée de chlorophylle *a* et *b*. C'est de cette lignée que les plantes supérieures comme *Arabidopsis thaliana* sont originaires. L'association de la chlorophylle *a* avec la phycobiline conduit à la lignée des algues rouges. Enfin, les algues non-vertes et non-rouges, appartiennent à la lignée « bleue » dans lesquelles la chlorophylle *a* est associée à la phycocyanine et à l'allophycocyanine. C'est le cas des glaucophytes par exemple (Archibald and Keeling, 2002; Maréchal, 2018).

Ensuite, plusieurs évènements d'endosymbiose ont lieu entre les algues rouges ou vertes et des eucaryotes hétérotrophes différents, conduisant à la lignée des algues brunes à partir des algues rouges, aux Euglenozoa et aux Chlorarachniophytes à partir des algues vertes. Le chloroplaste de ces lignées est caractérisé par quatre membranes : les deux plus internes provenant de la cyanobactérie initiale, et les deux plus externes provenant probablement des deux eucaryotes phagocytaires (Petroutsos et al., 2014). Parmi les espèces de la lignée brune, les Straménopiles sont les plus étudiés, avec respectivement la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* et l'eustigmatophyte *Microchloropsis gaditana* comme organismes de référence des microalgues marines (Andersen et al., 1998; Vieler et al., 2012). Ce sont ces deux derniers organismes qui ont été utilisés dans ce projet de thèse.

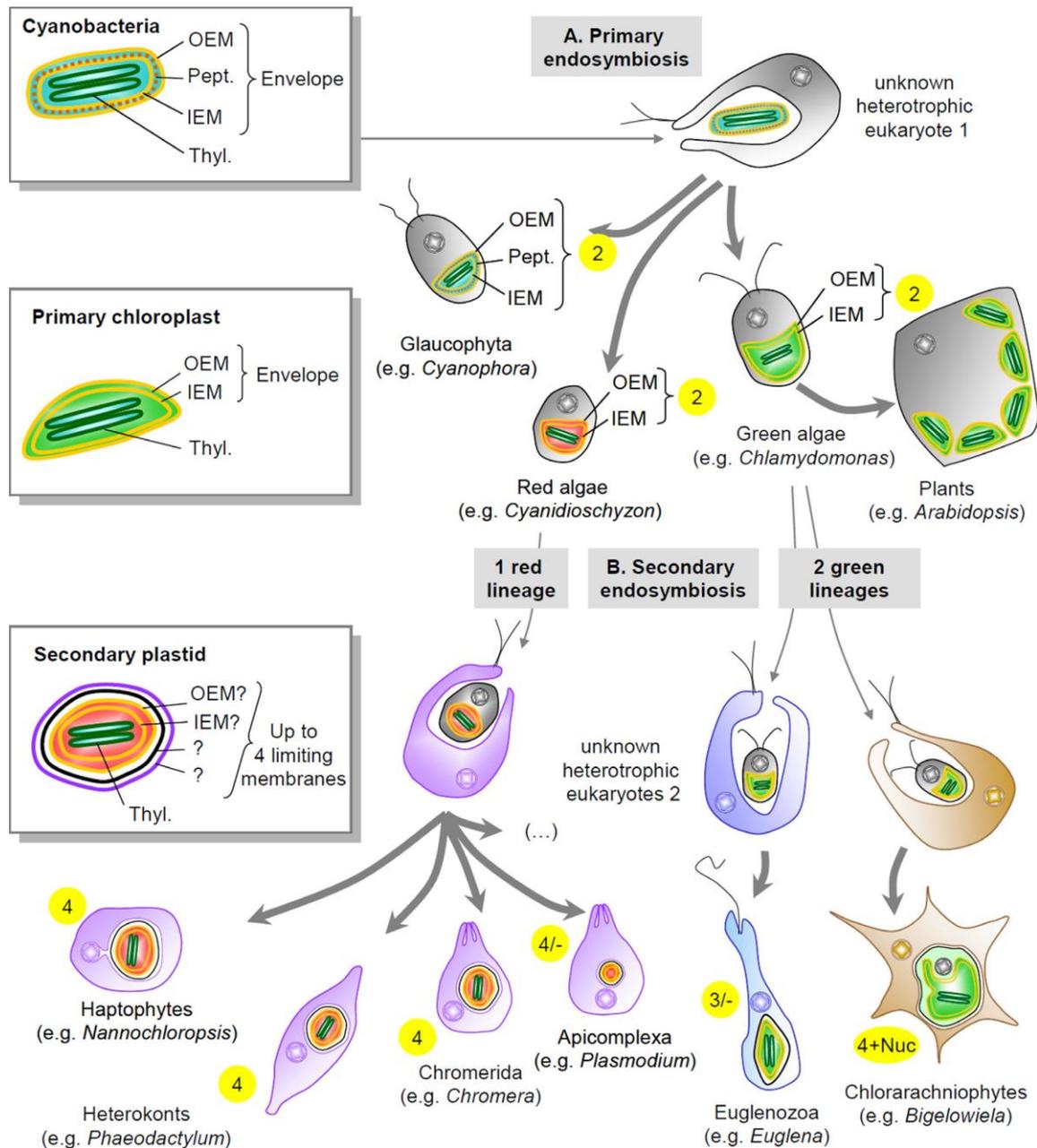


Figure 2. Représentation schématique de l'évolution du plaste (Petroustos et al., 2014). **(A)** Endosymbiose primaire. Cet événement d'endosymbiose a lieu entre un eucaryote hétérotrophe inconnu et une cyanobactérie, conduisant à trois lignées distinctes en fonction de leur composition en pigment : la lignée « bleue » (Glaucophytes), la lignée « rouge » et la lignée « verte ». De cette dernière découle les plantes supérieures. Chez ces trois lignées, le chloroplaste est entouré par deux membranes (**en jaune**). **(B)** Endosymbiose secondaire. Deux types d'endosymbiose secondaire impliquent deux algues vertes et eucaryotes hétérotrophes inconnus différents, donnant les Euglénozoaires et les Chlorarachniophytes. L'endosymbiose d'une algue rouge par un eucaryote hétérotrophe inconnu conduit à une grande diversité d'espèces regroupées sous la lignée des algues brunes. Les nombres en jaune indiquent le nombre de membranes autour du chloroplaste (**de 2 à 4**). Les phylums qui incluent des espèces qui ont perdu leurs plastes sont indiqués par **3/-** et **4/-**. Enfin, les phylums dans lesquels le noyau primaire a été conservé en tant que nucléomorphe sont indiqués par **4+Nuc**.

2.2 L'organisme eucaryote pluricellulaire photosynthétique : la plante supérieure

Le deuxième organisme d'étude de ce projet de thèse est l'angiosperme modèle *Arabidopsis thaliana*, dont le génome a été entièrement séquencé en 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). De plus, des banques de données en génétique et en protéomique sont facilement accessibles, et les méthodes de clonage sont connues et maîtrisées, ce qui en fait un organisme d'intérêt scientifique. Les plantes supérieures, comme décrit précédemment, dérivent des algues vertes, donc les chloroplastes ont la même structure avec deux membranes entourant les thylakoïdes. Malgré encore quelques zones d'ombres dans la compréhension complète des mécanismes moléculaires de la plante, la majorité des métabolismes est connue, avec les systèmes de régulation et les protéines impliquées, ce qui donne des premières hypothèses de travail pour comprendre ces métabolismes dans les microalgues.

3 Le phosphate, un nutriment essentiel pour le développement des plantes et des algues

Dans le milieu naturel, les organismes, plantes et microalgues, sont soumis à des stress biotiques, comme l'agression de pathogènes (champignons, bactéries, insectes...) mais également à des stress abiotiques dus à des facteurs environnementaux comme la sécheresse, le froid, la carence nutritionnelle. Parmi les macronutriments nécessaires au bon développement de l'organisme, le phosphate (P) et l'azote (N) sont des éléments essentiels (Hecky and Kilham, 1988; Mills et al., 2004; Moore et al., 2013). En effet, le phosphate est retrouvé dans la constitution de nombreuses molécules du vivant, par exemple, dans l'ADN, les protéines, mais participe également aux réactions de photosynthèse et de transfert d'énergie dans la cellule (*Better Crops With Plant Food: Phosphorus for Agriculture*, 1999; Wang et al., 2019; Wu et al., 2003). Quant à l'azote, il est également retrouvé dans la composition de l'ADN, mais est aussi un constituant principal des acides aminés et donc des protéines. En carence d'azote, les protéines photosynthétiques du chloroplaste, comme les photosystèmes, sont dégradées (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Également, la chlorophylle est dégradée, réduisant l'efficacité de la photosynthèse (Zhao et al., 2017). De ce fait, à long terme, une carence d'un de ces deux nutriments peut causer la mort de l'organisme. Pour pallier à cela, les organismes développent des stratégies d'adaptation, comme l'arrêt de la croissance et de la division cellulaire, pour limiter l'utilisation des protéines et stopper la réplication de l'ADN, et le remodelage moléculaire (Abida et al., 2015; Alipanah et al., 2018; Elser et al., 2007; Falciatore, 2000; Wu et al.,

2003). En effet, ces stratégies pourraient permettre à l'organisme d'augmenter l'absorption du nutriment, de réduire sa consommation, et de remobiliser les réserves.

Ce projet de thèse se concentre spécifiquement sur la compréhension du remodelage lipidique en carence de phosphate. En effet, de nombreuses études observent et décrivent ce remodelage de lipides (Abida et al., 2015; Hildebrand et al., 2012; Jouhet et al., 2004; Liang et al., 2019). Chez les plantes, les lipides phosphorés, les phospholipides, contiennent jusqu'à un tiers du phosphate intracellulaire (Poirier et al., 1991), constituant une source non négligeable de phosphate pour la cellule pour le maintien de son activité. Chez les plantes et les algues, les précédentes études observent une dégradation des phospholipides au profit d'une synthèse de lipides non-phosphorés (Figure 3), permettant de remobiliser le phosphate vers les molécules vitales (protéines, coenzymes, ATP, ...). Mais ce remplacement ne peut pas se faire de manière aléatoire, car les lipides n'ont pas le même rôle et la même structure dans la membrane. Le but de ce projet de thèse était donc de comprendre l'impact des remaniements lipidiques qui ont lieu en carence de phosphate sur l'architecture cellulaire, en étudiant les propriétés physicochimiques des lipides et leur organisation membranaire par une approche biophysique.

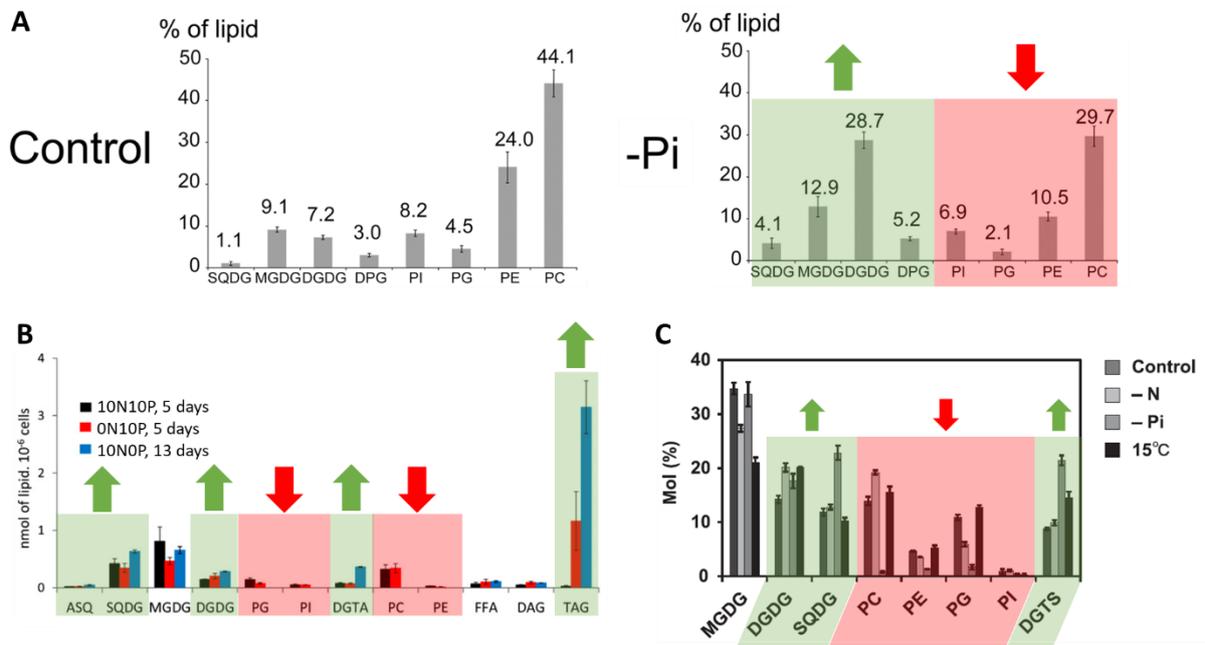


Figure 3. Remodelage lipidique en carence de phosphate chez les plantes et les algues. Les phospholipides (PC, PE, PG, PI) sont dégradés (rouge) et la quantité de galactolipides (MGDG, DGDG, SQDG, ASQ), cardiolipine (DPG), bêtaines lipides (DGTA, DGTS) et TAG augmentent (vert). (A) Chez la plante supérieure *Arabidopsis thaliana* d'après (Jouhet et al., 2004). (B) Chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* d'après (Abida et al., 2015). (C) Chez l'eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* d'après (Murakami et al., 2018).

Dans ce travail de thèse, l'architecture membranaire de la plante et des microalgues a été analysée, avec respectivement comme modèles *Arabidopsis thaliana* et les microalgues brunes *Phaeodactylum tricornutum* et *Microchloropsis gaditana*, par deux approches distinctes. La première utilise une technique physique, l'analyse structurale par diffraction de neutrons, sur des lipides isolés organisés en membranes biomimétiques, apportant une réponse sur les propriétés biophysiques des lipides, et ainsi comprendre les remaniements lipidiques observés en carence de phosphate. Des analyses réalisées sur des membranes constituées de lipides purs, permettent de renseigner les caractéristiques précises sur le lipide étudié (taille de la bicouche, limite de gonflement de la membrane, forces de répulsion des têtes polaires...), et ainsi apporter des connaissances sur leur rôle *in vivo* lorsqu'ils sont en mélange avec d'autres lipides.

Le deuxième axe de recherche, restreint aux microalgues, était une étude plus spécifique du rôle des lipides *in vivo*, par la formation de mutant Knock Out (KO) pour l'enzyme de synthèse du lipide concerné. Une analyse du profil lipidique des mutants obtenus et cultivés en carence de phosphate ou non, ainsi que les paramètres cellulaires, comme la croissance, l'activité photosynthétique et l'architecture des membranes par microscopie, étaient initialement prévus. Malheureusement, du fait de problèmes rencontrés lors du criblage des transformants et du contexte sanitaire, cette étude n'a pas abouti. La méthode utilisée est présentée dans la partie matériels et méthodes de ce rapport.

Une étude bibliographique est réalisée, afin de rappeler les bases sur le métabolisme des lipides, leurs propriétés biophysiques, et décrire quelques techniques physiques utilisées pour déterminer ces propriétés. Ensuite, ce rapport de thèse est construit en quatre chapitres, les deux premiers portant sur l'étude des lipides des microalgues et les deux suivants sur celle des lipides de plantes.

Données bibliographiques

Ce premier chapitre rassemble les connaissances actuelles sur la synthèse des acides gras et des lipides dans la cellule végétale, en se basant sur le modèle d'*Arabidopsis thaliana*. Les connaissances sur les microalgues sont également décrites. Seules les voies de synthèse et la localisation des lipides dans la cellule sont décrites. Ce mémoire n'aborde pas les enzymes impliquées dans les voies de synthèse et leur régulation, ayant déjà fait l'objet de revues détaillées (Boudière et al., 2014; Li-Beisson et al., 2019). Ce chapitre aborde également les propriétés biophysiques connues des lipides, et des techniques connues pour les caractériser. Une partie plus complète sur la diffraction de neutrons est présentée dans la partie matériel et méthode. Ce travail bibliographique a fait l'objet d'un chapitre de livre « Biophysical properties of glycerolipids and their impact on membrane architecture and biology » (*Lipids In Plants And Algae: from fundamental science to industrial applications.*, 2022).

1 De la synthèse des acides gras à celle des glycérolipides chez les organismes photosynthétiques

Chez les plantes et les algues, les glycérolipides sont du glycérol-3-phosphate sur lequel un à trois acides gras sont estérifiés. Les lipides avec un seul acide gras sont appelés lysolipides, ceux avec deux acides gras composent majoritairement les membranes biologiques, alors qu'avec trois acides gras, il s'agit de lipides de réserve, les triacylglycérols, et sont accumulés sous forme de gouttelettes lipidiques (*Figure 4*). La première partie de cette section est un rappel sur la synthèse des acides gras chez les organismes photosynthétiques, avant de poursuivre sur leurs propriétés biophysiques et leur rôle structural dans la membrane. La deuxième partie discute plus en détail de la synthèse de chaque classe de lipides dans la plante, avec un aperçu de ce qui est connu dans les algues.

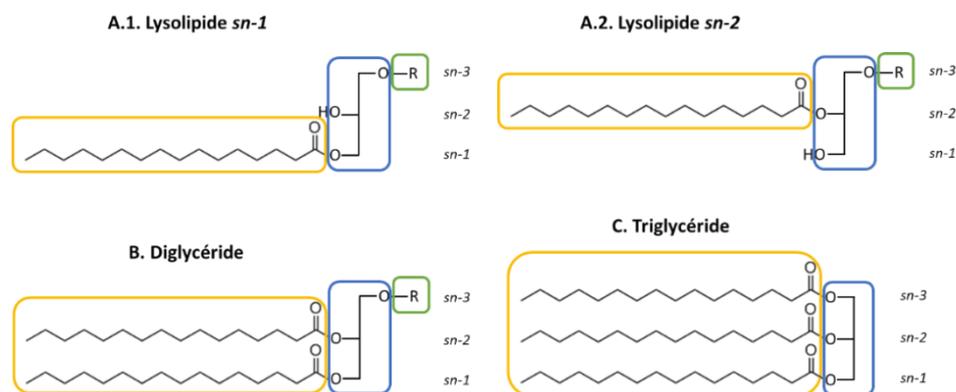


Figure 4. Structure des glycérolipides en fonction du nombre d'acides gras. Les lysolipides portent un seul acide gras estérifié en position *sn-1* ou *sn-2* (**A.1** et **A.2**). Les diglycérides possèdent deux acides gras (**B**), et sont des constituants majoritaires des membranes. Les triglycérides sont composés de trois acides gras (**C**), et sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques. **En jaune**, les acides gras, dont la longueur et les insaturations peuvent varier (ici il s'agit d'acides gras en 16:0), **en bleu**, le squelette glycérol, **en vert**, la tête polaire variable notée R. **sn-x** est la numérotation stéréochimique, indiquant la position de l'acide gras sur le motif glycérol. La tête polaire est en position *sn-3*.

1.1 La synthèse des acides gras et leurs propriétés physiques

1.1.1 Les acides gras : un rôle majeur dans la structure des membranes

Dans les plantes et les algues, les acides gras sont des acides carboxyliques avec une chaîne hydrocarbonée de 14 à 24 carbones et un groupe carboxyle terminal. Chez les organismes photosynthétiques, la synthèse des acides gras se déroule dans le stroma des chloroplastes. Les voies de synthèses des acides gras sont très bien caractérisées chez *Arabidopsis thaliana*. Chez les algues dérivées d'endosymbiose primaire ou secondaire, les voies de synthèse sont établies par extrapolation, mais le trafic des acides gras entre les compartiments cellulaires reste encore inconnu.

La diversité des acides gras se fait par la longueur de la chaîne carbonée, mais également par le nombre de doubles liaisons entre deux carbones, aussi appelées insaturations. Chez les plantes, les lipides membranaires contiennent majoritairement des acides gras avec 16 ou 18 carbones, alors que chez les algues, des acides gras jusqu'à 24 carbones sont détectés (*Table 1*). La nomenclature des acides gras se fait comme suit : le premier nombre indique la longueur de la chaîne carbonée, le chiffre suivant est le nombre d'insaturations. Par exemple, un acide gras 16:1 a une chaîne carbonée de 16 carbones (C16) et possède une double liaison. Ici, le positionnement des doubles liaisons n'est pas précisé.

Table 1. Liste des acides gras communs retrouvés chez la plante supérieure et différentes microalgues. Les espèces présentées ici sont : *Arabidopsis thaliana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Microchloropsis gaditana*, et *Spirulina maxima*. **DHA** : acide docosahexaénoïque, **EPA** : acide eicosapentaénoïque. Les valeurs sont exprimées en mol %. La position des doubles liaisons n'est pas précisée. D'après ^a(Jouhet et al., 2017), ^b(Giroud et al., 1988) et ^c(Ötles and Pire, 2001).

Acide gras (mol%)	Nom (Acide...)	Angiosperme (plante)	Chlorophyte (microalgue verte)		Hétérokote (microalgue brune)		Cyanobactérie
		<i>A. thaliana</i> ^a	<i>C. reinhardtii</i> ^b	<i>C. vulgaris</i> ^c	<i>P. tricornutum</i> ^a	<i>M. gaditana</i> ^a	<i>S. maxima</i> ^c
14:0	Myristique	0.07	-	0.7	4.3	2.5	-
16:0	Palmitique	17.8	22	14.4	15.2	34.0	35.8
16:1	Palmitoléique	3.7	7	4.0	22.6	32.0	0.9
16:2	Héxadécadiénoïque	-	2	5.3	3.5	0.7	4.6
16:3	Héxadécatriénoïque	1.5	3	4.9	8.6	0.2	-
18:0	Stéarique	0.5	2	1.6	2.8	1.8	1.5
18:1	Oléique	26.2	16	17.6	0.9	3.2	5.0
18:2	Linoléique	12.2	8	12.0	2.7	1.7	16.3
18:3	Linoléinique	38.2	25	15.8	1.4	0.4	18.2
18:4	Stéaridonique	-	2	-	-	0.1	-
20:1	Eicosénoïque	-	-	-	0.3	0.1	-
20:2	Eicosadiénoïque	-	-	-	0.4	1.1	0.6
20:4	Arachidonique	-	-	-	1.8	1.5	-
20:5	EPA	-	-	-	30.3	20.1	-
22:1	Erucique	-	-	-	-	0.4	-
22:5	Docosapentaénoïque	-	-	-	0.4	-	-
22:6	DHA	-	-	0.3	4.2	-	-
24:0	Lignocérique	-	-	0.2	0.7	-	0.6

Un acide gras saturé est désaturé par des désaturases qui ajoutent une double liaison à une position spécifique de la chaîne carbonée. Les acides gras monoinsaturés ne portent qu'une seule insaturation, alors que les polyinsaturés peuvent porter jusqu'à six doubles liaisons. Deux types d'insaturation existent, modifiant la forme de la chaîne carbonée et la fluidité de membrane (Figure 5). Les insaturations *trans* ne modifient pas la structure de la chaîne, qui reste droite, comme pour les acides gras saturés (Figure 5.A). *In vivo*, chez les organismes photosynthétiques, la configuration *trans* est présente dans un seul acide gras, le 16:1 Δ 3 en position *sn*-2 (numérotation stéréochimique) du phosphatidylglycérol (PG) dans les membranes des thylakoïdes (Dubacq and Tremolieres, 1983). Les autres insaturations ont une conformation *cis*, introduisant un angle de 30° dans la chaîne carbonée. Cette mesure a pu être déterminée par dynamique moléculaire sur le lipide 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PLPC 16:0-18:2) (Hyvönen et al., 1997). La longueur et le degré d'insaturations des acides gras ont donc un impact sur les propriétés biophysiques des membranes. Par exemple, il a été montré que les acides gras saturés rendent la membrane plus rigide que les acides gras insaturés, qui favorisent sa fluidité (Ibarguren et al., 2014; Maulucci et al., 2016).

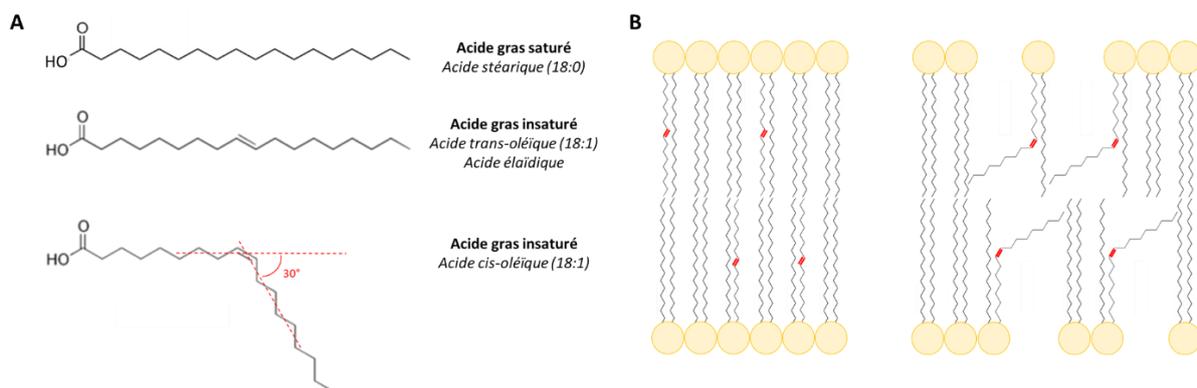


Figure 5. Structure des deux types d'insaturations possibles sur une chaîne d'acide gras. **(A)** Structure d'un acide gras saturé et mono-insaturé *trans* ou *cis*. Seul l'acide gras 18:1*t* est retrouvé dans le lipide phosphatidylglycérol (PG). L'insaturation en *cis*, ajoute un angle de 30° dans la chaîne carbonée. **(B)** Représentation schématique d'une membrane lipidique contenant des acides gras saturés et *trans*-insaturés (**à gauche**), ou des acides gras saturés et *cis*-insaturés (**à droite**). L'insaturation *cis* apporte de l'espace entre les lipides, influençant la perméabilité et la fluidité de la membrane.

Dans ses travaux, Mouritsen a écrit que l'activité enzymatique des désaturases et des élongases peut directement affecter la fluidité de la membrane en augmentant l'abondance d'acides gras mono- et poly-insaturés dans une membrane de phospholipides (Mouritsen, 2005). En accord avec cette information, Maulucci et al. ont montré que si la quantité d'acides gras polyinsaturés augmente, la membrane est plus fluide, et inversement (Maulucci et al., 2016). La fluidité membranaire dépend également de la fluidité des chaînes d'acides gras, et donc de leur température de transition de phase entre leur état cristallin (phases gel L_{β}' et P_{β}') et leur état fondu (phase fluide

L_α) (voir section 2.2). De nombreuses études ont montré que la température de transition de phase des acides gras était dépendante de la longueur de la chaîne carbonée et du nombre d'insaturations. Plus la chaîne est longue, plus la température de transition de phase est élevée (Fragneto et al., 2003), et plus la chaîne est insaturée, plus la température diminue (Koynova and Tenchov, 2008). Les insaturations modifient également les interactions entre les acides gras adjacents, et donc la compressibilité de la membrane. En effet, une compression appliquée sur une membrane composée d'acides gras saturés, donc droits, rapproche les lipides les uns aux autres formant une membrane dense et rigide. Cependant, en cas de compression, l'angle formé par les acides gras insaturés maintient un espace entre les lipides adjacents, rendant la membrane plus perméable (*Figure 5.B*) (de Mendoza and Pilon, 2019). Enfin, les simulations de dynamique moléculaire et les mesures biochimiques indiquent que les acides gras polyinsaturés induisent une courbure de la membrane du fait de leur encombrement stérique (Pinot et al., 2014; Risselada and Marrink, 2009). Ils influencent également l'épaisseur de la bicouche. Par exemple, à 41°C, l'épaisseur de la molécule 22:6 est de $8,2 \pm 2,1$ Å, alors qu'elle est de $14,2 \pm 3,6$ Å pour le 18:1, confirmant que les angles formés par les insaturations *cis* favorisent le repliement des chaînes (Fernandes et al., 2002).

Les membranes adaptent leur composition en acides gras selon leur fonction et leur architecture. Par exemple, les organites et les vésicules, qui possèdent des membranes fortement courbées, sont enrichies en acides gras polyinsaturés diminuant ainsi la rigidité de la membrane (Takamori et al., 2006; Yang et al., 2012). En effet, le manque d'acides gras polyinsaturés compromet la formation de vésicules (Tixier-Vidal et al., 1986). En réponse à un stress environnemental, comme la baisse de température, il est noté chez les organismes, un changement de la proportion d'acides gras insaturés dans leurs membranes.

1.1.2 Les acides gras : un marqueur de la localisation de la synthèse des lipides chez les organismes photosynthétiques

Les lipides des membranes des plantes sont composés de deux longueurs d'acides gras principales, les C16 et les C18, synthétisés dans le chloroplaste. La désaturation des acides gras en 16:0 conduit à la formation des 16:3, et celle des 18:1, aux 18:3. A l'extérieur du chloroplaste, seules les désaturations des acides gras à 18 carbones se produisent (Heemskerk et al., 1991). Le premier précurseur de la biosynthèse des lipides est l'acide phosphatidique (PA), composé d'un squelette glycérol-3-phosphate sur lequel sont estérifiés deux acides gras en position *sn-1* et *sn-2*. Chez les plantes, la longueur de la chaîne carbonée en position *sn-2* indique le lieu de synthèse du squelette diacylglycérol (DAG). En effet, deux voies de synthèse se distinguent : la voie « procaryotique » et la

voie « eucaryotique ». La voie « procaryotique », ou plastidiale, commence par la synthèse du PA dans l'enveloppe du chloroplaste par l'action séquentielle de l'acyl-ACP/glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT, ou ATS1) et de l'acyl-ACP/acide lysophosphatique acyltransférase (LPAAT, ou ATS2) (Kang et al., 2020). Ces enzymes produisent presque exclusivement du PA 18:1/16:0 (Frentzen et al., 1983). Ceci est en accord avec la découverte que le chloroplaste isolé (dans lequel seule la voie procaryotique peut opérer) synthétise du PA, du DAG, du PG et des glycolipides avec un acide gras en C16 en position *sn-2* (Heinz' and Roughan, 1983; Roughan et al., 1980). La voie « eucaryotique » se déroule dans le réticulum endoplasmique, et la synthèse du PA est réalisée par les isoenzymes acyltransférases microsomales, glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT9) (Shockey et al., 2016; Singer et al., 2016) et acide lysophosphatidique acyltransférase (LPAAT2 à 5) (Kim and Huang, 2004; Körbes et al., 2016; Yu et al., 2004). Les lipides contiennent alors un acide gras C18 en position *sn-2* du squelette glycérol et un acide gras en C16 ou C18 en position *sn-1* (Frentzen et al., 1983).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les deux signatures procaryotes et eucaryotes sont retrouvées dans les galactolipides synthétisés dans le chloroplaste. Un trafic du squelette DAG se produit donc du réticulum endoplasmique (RE) vers le chloroplaste, apportant la signature C18 en position *sn-2*. Le transporteur trigalactosyldiacylglycérol (TGD) est essentiel dans ce transport (Xu et al., 2010), mais la nature de la molécule transférée (PA, DAG, ou PC) reste encore en débat (Block and Jouhet, 2015). La Figure 6 résume ces informations (Figure 6.A).

Chez les microalgues, la synthèse des acides gras se produit également dans le chloroplaste, mais certaines différences sont notables. Chez les microalgues d'eau douce, comme la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la longueur des acides gras est identique à celle trouvée chez la plante, mais les lipides plastidiaux n'ont pas d'acide gras en C18 et seulement du C16 en position *sn-2*, suggérant l'absence du trafic du squelette DAG entre le RE et le chloroplaste. Cependant, une étude a identifié une acide lysophosphatidique acyltransférase dans le RE capable d'estérifier un acide gras C16 en position *sn-2* (Kim et al., 2018). De plus, la machinerie TGD est présente chez les algues vertes (Warakanont et al., 2015), rendant possible l'existence du trafic du squelette DAG du RE vers le chloroplaste dans ces organismes. Les algues vertes possèdent également en grande quantité un acide gras typique en 16:4 sur le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), produit par la désaturase $\Delta 4$ dans le chloroplaste (Giroud et al., 1988; Zäuner et al., 2012) (Figure 6.B).

Les microalgues marines sont riches en acides gras polyinsaturés à longues chaînes (Li-Beisson et al., 2019). Par exemple, le 20:5 est trouvé en position *sn-1* des glycolipides chez la diatomée *Phaeodactylum tricorutum*, alors que du C16 se trouve en position *sn-2*, suggérant une origine plastidiale du squelette DAG. Cependant, la synthèse du 20:5 ne se déroule pas dans le chloroplaste,

mais est obtenue par élongation et désaturation dans le RE, probablement à partir du 16:0 par la voie oméga (voie ω) avant de retourner dans le chloroplaste (Petroutsos et al., 2014; Smith et al., 2021). A l'heure actuelle, ce trafic reste encore inconnu. Contrairement à *Arabidopsis thaliana*, il n'y a pas d'évidence de la synthèse du 18:0 dans le chloroplaste (Zulu et al., 2018), et le 16:1 est produit par désaturation du 16:0 dans le plaste avant d'être exporté à l'extérieur, vers les autres membranes (Smith et al., 2021) (Figure 6.C).

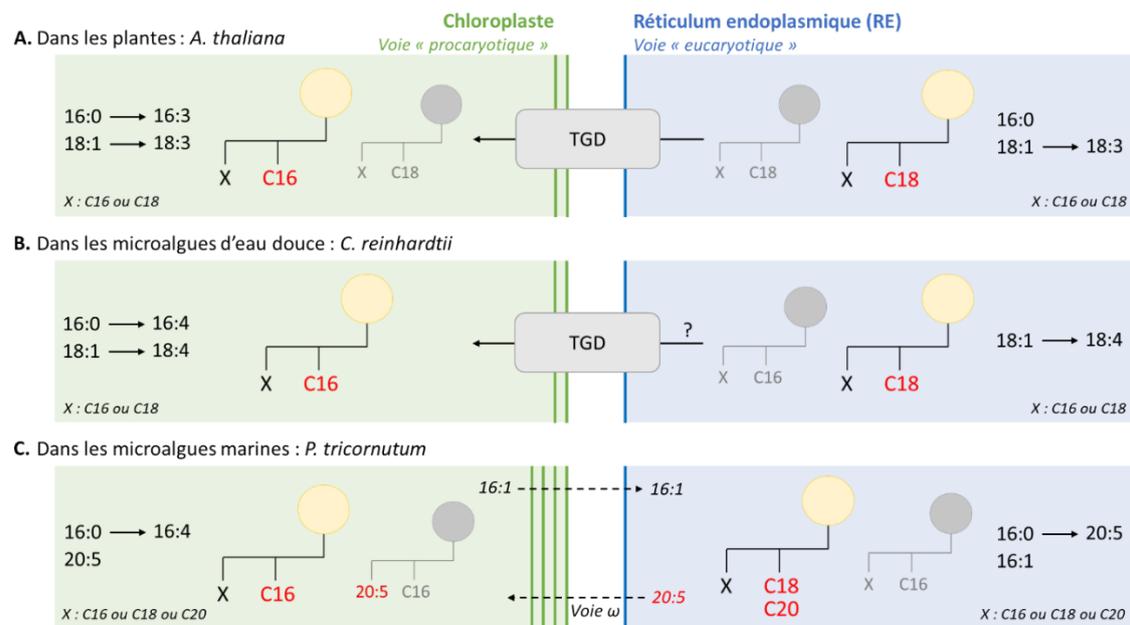


Figure 6. Représentation schématique de la diversité des acides gras et leur localisation dans la cellule, selon la voie « procaryotique » dans le chloroplaste (**en vert**) ou la voie « eucaryotique » dans le réticulum endoplasmique (**en bleu**). Les lipides synthétisés dans le compartiment cellulaire sont représentés en **jaune**, alors que les lipides exportés sont en **gris**. Les acides gras de la signature « procaryotique » ou « eucaryotique » sont en position *sn*-2 et en **rouge**. Exemple d'acides gras présents chez **(A)** la plante supérieure, *Arabidopsis thaliana*, **(B)** la microalgue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, et **(C)** la diatomée, *Phaeodactylum tricornutum*, dont le chloroplaste est entouré par quatre membranes. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, le transporteur TGD est présent, mais les lipides du chloroplaste ne portent pas la signature de la voie « eucaryotique ». Chez *Phaeodactylum tricornutum*, aucun homologue la machinerie TGD n'a été trouvé. **TGD** : trigalactosyldiacylglycérol (transporteur).

1.2 La synthèse des glycérolipides et leurs propriétés biophysiques

Chez ces organismes, il existe une douzaine de classes de glycérolipides regroupées en sous-groupes selon leur tête polaire en position *sn*-3 du motif glycérol : les phospholipides, les galactolipides et les bêtaines lipides présents uniquement chez les algues. La localisation des lipides est intimement liée à leur lieu de synthèse, à savoir, le chloroplaste, le système endomembranaire, la mitochondrie. De manière générale, les phospholipides et les bêtaines lipides composent majoritairement les membranes extra-plastidiales, alors que les galactolipides constituent les membranes du chloroplaste

(Cook et al., 2021; Dorne et al., 1990; Harwood, 2004). La synthèse du diphosphatidylglycérol (DPG), ou cardiolipine, est réalisée dans la mitochondrie (Frentzen and Griebau, 1994).

1.2.1 Les phospholipides

Les phospholipides sont reconnaissables par la présence d'un groupement phosphate dans la composition de la tête polaire. La diversité des groupements alcool attachés au phosphate forme la diversité des phospholipides. Parmi eux, la phosphatidylcholine (PC), le phosphatidylglycérol (PG) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont majoritaires par rapport à la phosphatidylsérine (PS), au phosphatidylinositol (PI) et à l'acide phosphatidique (PA), dont les structures sont présentées ci-dessous (Figure 7). Les phospholipides composent en grande quantité les membranes extra-plastidiales, mais de la PC, du PG et du PI sont aussi retrouvés dans la composition des membranes du chloroplaste (Block et al., 2007; Douce et al., 1973).

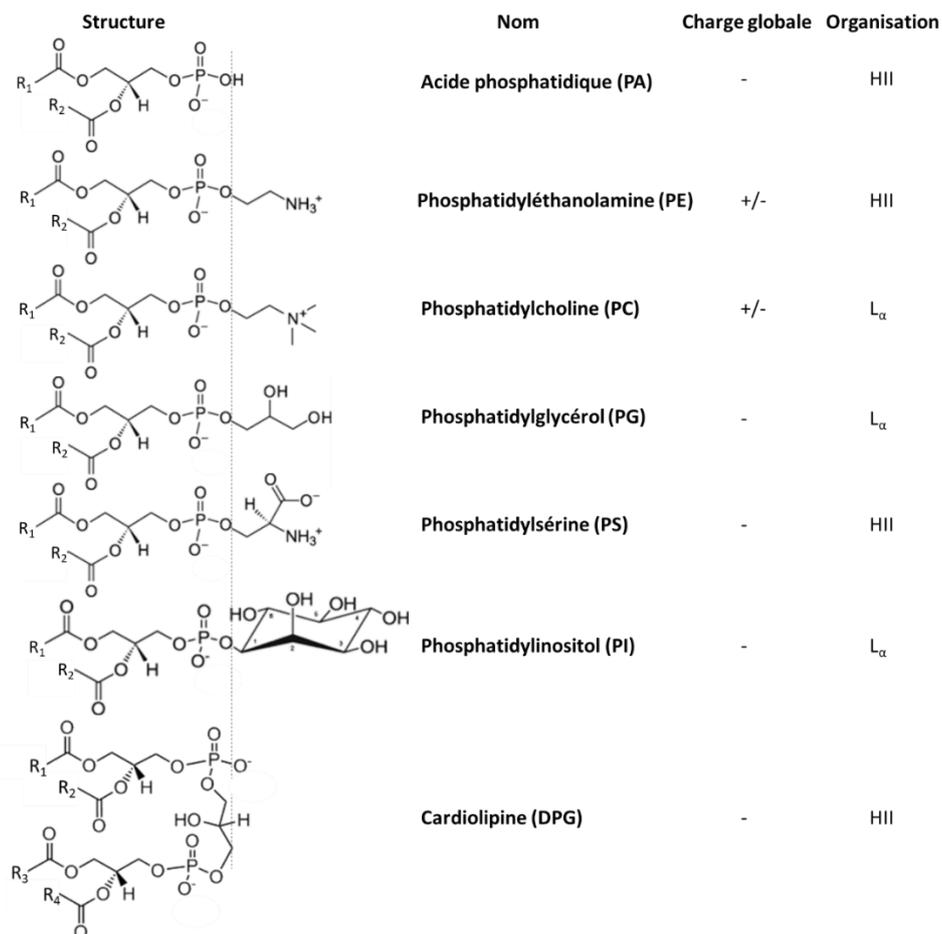


Figure 7. Structures des différents phospholipides et de la cardiolipine. La charge globale du lipide dans des conditions physiologiques est notée : - pour une charge apparente négative, ou +/- pour une charge apparente neutre (zwitterion). L'organisation de la membrane composée du lipide indiqué, est renseignée à titre indicatif par L $_{\alpha}$ pour une phase lamellaire, ou HII pour une phase hexagonale inversée. R $_1$ à R $_4$ sont les acides gras estérifiés en position *sn-1* et *sn-2* du motif glycérol.

Chez les plantes, la synthèse des phospholipides se déroule dans le réticulum endoplasmique (*Figure 10*). Le PA est le précurseur de cette synthèse, en servant de substrat pour la synthèse du CDP-DAG par la CDP-diacylglycérol synthase (CDS) ou du DAG par l'acide phosphatidique phosphatase (PAP) ou hydrolase phosphatidique (PAH). Le CDP-DAG est ensuite utilisé pour la synthèse du PI par la phosphatidylinositol synthase (PIS) et celle du PG par la phosphatidylglycérol synthase (PGS). Le DAG est le précurseur du PE et de la PC en suivant la voie Kennedy (Dubots et al., 2012), respectivement par les enzymes CDP-éthanolamine:DAG éthanolamine phosphotransférase (EPT) et CDP-choline:DAG choline phosphotransférase (CPT). Les plantes ne pouvant pas trouver de choline dans leur environnement, le pool majeur de choline est synthétisé par la triméthylation de la phosphoéthanolamine (PEtn) par les phosphor-base-N-méthyltransférases (PMTs) pour former la phosphocholine (PCho). La PEtn et la PCho sont ensuite activées respectivement en CDP-éthanolamine (CDP-Etn) ou CDP-choline (CDP-Cho) par la CTP:phosphoéthanolamine cytidylyltransférase (ECT) ou la CTP:phosphocholine cytidylyltransférase (CCT), avant estérification en position *sn-3* du DAG pour former la PE par les EPT ou de la PC par les CPT (Nakamura, 2021). Quantitativement, la PC et le PG sont les phospholipides majoritaires des organismes photosynthétiques. Chez *Arabidopsis thaliana*, presque toutes les enzymes impliquées dans la synthèse des phospholipides ont été identifiées et localisées (Nakamura, 2021).

Chez les plantes, une petite quantité de PS est détectée dans les feuilles (environ 2 % du total des phospholipides). Sa synthèse est réalisée à partir de la PE par la PS synthase (PSS) dans le RE (Vance and Steenbergen, 2005). La PS est décrite en tant que lipide signal car, même à faible concentration, elle est reconnue par des protéines, comme dans la voie de signalisation de l'auxine (Colin and Jaillais, 2020). La cardiolipine est un diphosphatidylglycérol (DPG) contenant quatre acides gras estérifiés à deux motifs glycérols, chacun lié à un groupement phosphate, reliés entre eux par un troisième motif glycérol. Chez les eucaryotes, la cardiolipine est exclusivement localisée dans la membrane interne de la mitochondrie. Sa synthèse résulte de la condensation du PG sur une molécule de CDP-DAG, catalysée par la cardiolipine synthase (CLS) (Katayama et al., 2004; Zhou et al., 2016).

Chez les algues, les gènes codants pour les enzymes responsables de la synthèse des phospholipides peuvent être identifiés par homologie de séquences avec les plantes. A part le PG, qui a probablement aussi une localisation de synthèse double dans le RE et dans le plaste, la synthèse des phospholipides est prédite pour être localisée dans le RE. Par analogie, les voies de synthèse des phospholipides sont supposées être similaires chez les plantes et les algues, mais chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la PC ne rentre pas dans sa composition lipidique du fait de l'absence des gènes PEMT et PEAMT (Hirashima et al., 2018).

1.2.2 Les galactoglycérolipides

Chez les plantes, les galactoglycérolipides, incluant les galactolipides mono- et digalactosyldiacylglycérol (respectivement MGDG et DGDG) et le sulfolipide sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) (Figure 8), sont des composants majoritaires des membranes photosynthétiques. Ils représentent environ 80 % des lipides de la membrane des chloroplastes (Block et al., 1984). Le chloroplaste est délimité par deux membranes, la membrane interne et la membrane externe, dont la composition en lipides est connue. La membrane interne et les thylakoïdes contiennent du MGDG, du DGDG, du SQDG et du PG, alors que la membrane externe contient de la PC et du PI en plus du MGDG, du DGDG et du PG (Block et al., 1984; Douce et al., 1973; Douce and Joyard, 1990). Chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la composition de l'enveloppe du chloroplaste et des thylakoïdes sont similaires à celle du chloroplaste de plante, à la seule différence qu'il n'y a pas de PC mais un peu de DGTS et de PE dans l'enveloppe externe (Yang et al., 2017).

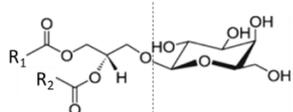
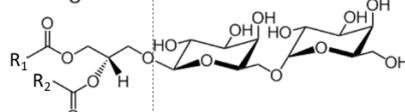
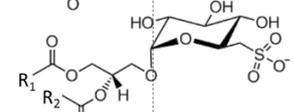
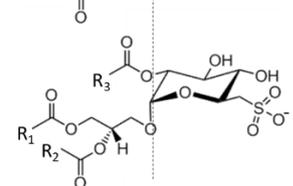
Structure	Nom	Charge globale	Organisation
	Monogalactosyldiacylglycérol (MGDG)	0	HII
	Digalactosyldiacylglycérol (DGDG)	0	L _α
	Sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG)	-	L _α
	Acyl-sulfoquinovosyldiacylglycérol (ASQD)	-	Inconnue

Figure 8. Structures des galactoglycérolipides, comprenant la classe des galactolipides (MGDG et DGDG) et des sulfolipides (SQDG et ASQD). La charge globale du lipide est notée : – pour une charge apparente négative, ou **0** s'il n'y a pas de charge. L'organisation de la membrane composée du lipide indiqué, est renseignée à titre indicatif par **L_α** pour une phase lamellaire, ou **HII** pour une phase hexagonale inversée. L'organisation de l'ASQD reste encore inconnue. **R₁** à **R₂** sont les acides gras estérifiés en position *sn-1* et *sn-2* du motif glycérol. L'ASQD possède un troisième acide gras **R₃** estérifié sur la tête polaire.

La synthèse des glycolipides a lieu dans l'enveloppe du plaste (Figure 10). Le DAG est le précurseur du MGDG et du SQDG. Il peut provenir de la synthèse du PA par la PAP dans le chloroplaste, et possède donc la signature de la voie procaryote avec un acide gras en C16 en position *sn-2*, mais il peut également provenir d'un DAG synthétisé dans le RE. En effet, comme décrit précédemment, les glycolipides portent aussi la signature de la voie eucaryote avec un acide gras C18 en position *sn-2*. Les

MGDG synthases catalysent l'addition d'un galactose, provenant d'un UDP-galactose, sur la position *sn-3* du squelette glycérol avec une liaison β -anomérique (Kelly et al., 2003), et les SQDG synthases ajoutent un groupement sulfoquinovose en position *sn-3* du glycérol (Yu et al., 2002). Par glycosylation du MGDG par les DGDG synthases, un second galactose est ajouté au premier sucre avec une liaison α -anomérique.

Un sulfolipide acylé, l'acyl-SQDG (ASQD), a été identifié chez certaines algues, comme *Chlorella vulgaris* (Morimoto et al., 1993), *Chlamydomonas reinhardtii* (Riekhof et al., 2003), *Phaeodactylum tricornutum* (Naumann et al., 2011) et les dinoflagellées (observation personnelle). La structure de l'ASQD est identique à celle du SQDG avec, en plus, un troisième acide gras estérifié sur le carbone 2 du sulfoquinovose de la tête polaire (Figure 8) (Naumann et al., 2011; Riekhof et al., 2003). La synthèse d'ASQD dépend de celle du SQDG. En effet, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, le mutant KO de la SQDG synthase, enzyme de synthèse du SQDG, est déficient en SQDG, mais également en ASQD (Riekhof et al., 2003). La localisation de l'ASQD est encore méconnue, mais comme sa synthèse est dépendante de celle du SQDG, il pourrait être localisé dans le chloroplaste. Le troisième acide gras est généralement l'acide gras le plus long et polyinsaturé de la cellule : 18:3 pour *Chlamydomonas reinhardtii*, 20:5 pour *Phaeodactylum tricornutum* and 22:6 pour les dinoflagellées (Riekhof et al., 2003). L'orientation et l'insertion de ce troisième acide gras dans la membrane ne sont pas encore résolues. Dans notre étude, qui sera détaillée plus tard dans ce mémoire (chapitre 2), nous proposons deux hypothèses : (1) l'acide gras se place dans la même membrane que les deux autres, ce qui aurait pour conséquence un aplatissement de la tête polaire sur la membrane, ou (2) l'acide gras est ancré dans une membrane adjacente, ce qui maintiendrait deux bicouches en contact par effet de pontage.

1.2.3 Les bétaines lipides

Dans les plantes inférieures et les algues, une troisième classe de glycérolipides est présente en plus des phospholipides et des galactoglycérolipides : les bétaines lipides (Sato, 1992). La présence des bétaines lipides a été décrite en premier dans la chrysophyte *Ochromonas danica* par Nichols and Appleby (Nichols and Appleby, 1969). En regardant l'évolution, les bétaines lipides sont exclusivement présents dans les algues et chez certaines plantes ne faisant pas de fleurs, comme les lichens, les mousses et les fougères (Künzler and Eichenberger, 1997). Ils sont donc absents dans les plantes à graines (angiospermes et gymnospermes).

Il existe trois bétaines lipides, dont la répartition dans les organismes est spécifique. 1,2-diacylglycéryl-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homosérine (DGTS) est retrouvé dans les fougères, les

mousses, les algues vertes, et d'autres espèces d'algues dérivées d'endosymbiose secondaire. 1,2-diaclyglycéril-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)- β -alanine (DGTA) et 1,2-diaclyglycéril-3-O-carboxy-(hydroxyméthyl)-choline (DGCC) sont majoritairement trouvés dans les algues brunes, comme *Phaeodactylum tricornutum* et *Thalassiosira pseudonana* respectivement (Cañavate et al., 2016; Guschina and Harwood, 2006; Sato, 1992). DGCC est un constituant des Haptophyceae (Kato et al., 1996). Chez les algues vertes, une grande quantité de bétaines lipides est souvent synonyme d'une faible quantité, voire d'une absence de PC (Kalisch et al., 2016; Sato, 1992). C'est le cas par exemple de *Chlamydomonas reinhardtii* qui ne contient pas de PC mais une grande quantité de DGTS (Sakurai et al., 2014).

La localisation des bétaines lipides dans la cellule reste encore indéterminée. Cependant, Eichenberger a étudié la composition en lipides des chloroplastes de nombreux groupes phylogénétiques, comme les Chlorophytes, les Bryophytes et les Ptéridophytes, et a conclu que la quantité de DGTS n'y était pas significative, suggérant que le DGTS est un constituant extraplastidial (Eichenberger, 1993). De plus, la membrane plasmique de *Dunaliella salina* contient une forte concentration en DGTS (Sheffer et al., 1986). Des études utilisant l'immunomicroscopie électronique ont montré que le DGTS et le DGTA étaient localisés dans les membranes non-plastidiales (Künzler et al., 1997). Il en est de même pour la localisation du DGCC. Les premières expériences ont été menées sur *Pavlova lutheri* et montrent que le DGCC était localisé dans les membranes non-plastidiales, mais nécessitent plus d'investigations (Eichenberger and Gribo, 1997). En conclusion, tous ces travaux suggèrent fortement que les bétaines lipides ne sont pas localisés dans les membranes du chloroplaste mais dans celles des autres compartiments cellulaires.

Les bétaines lipides sont des lipides non-phosphorés (*Figure 9*), dont la structure est très proche de celle de la PC. La tête polaire du DGTS et du DGTA sont des isomères structuraux. La voie de biosynthèse des bétaines lipides est seulement élucidée pour le DGTS, qui se déroule dans le RE catalysée par l'enzyme BTA1 (Riekhof et al., 2005) (*Figure 10*). Des recherches sont conduites pour déterminer les voies de biosynthèse du DGTA, qui dérive du DGTS (Vogel and Eichenberger, W., 1992), et celles du DGCC (Kato et al., 1996), mais les enzymes responsables de leur synthèse restent inconnues. De même, l'organisation des bétaines lipides dans une membrane n'a pas été étudiée, mais comme leur structure est similaire à celle de la PC, une hypothèse serait que les bétaines lipides s'organisent également en bicouches.

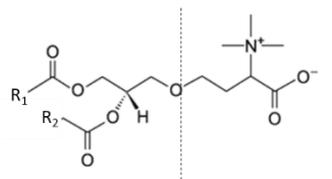
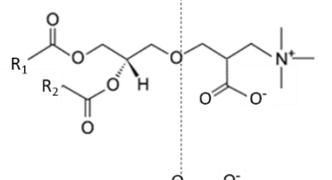
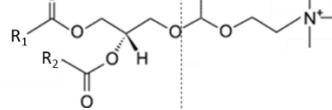
Structure	Nom	Charge globale	Organisation
	1,2-diacylglycéril-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homosérine (DGTS)	+/-	L _α ?
	1,2-diacylglycéril-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)-β-alanine (DGTA)	+/-	L _α ?
	1,2-diacylglycéril-3-O-carboxy-(hydroxyméthyl)-choline (DGCC)	+/-	L _α ?

Figure 9. Structures des bétaines lipides retrouvés dans les algues et les plantes inférieures ne faisant pas de fleur. La charge globale du lipide est notée +/- pour une charge apparente neutre (zwitterion) dans les conditions physiologiques. L'organisation des bétaines lipides dans une membrane n'est pas connue, mais possiblement lamellaire L_α. R₁ et R₂ sont les acides gras estérifiés en position *sn-1* et *sn-2* du motif glycérol.

Ainsi, pour résumer, par analogie avec les plantes et également par prédiction de la localisation des enzymes de synthèse de lipides, une répartition générale des lipides dans les microalgues peut être faite : les membranes du plaste sont majoritairement composées de glycolipides, alors que les phospholipides et les bétaines lipides constituent les membranes non plastidiales. La Figure 10 résume de façon schématique les voies de biosynthèse des lipides précités.

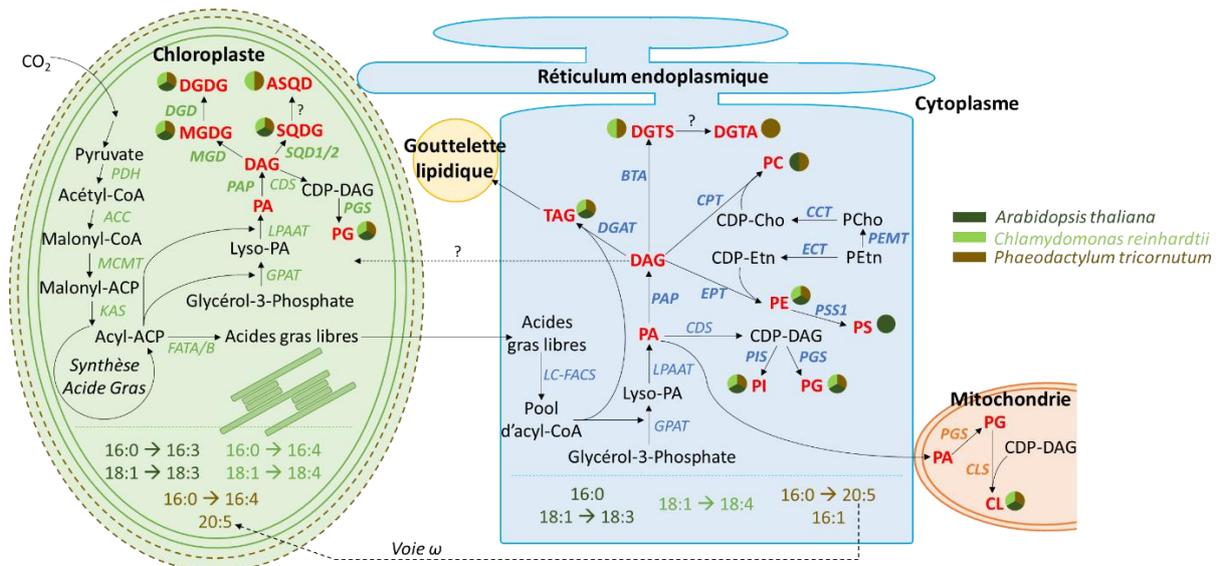


Figure 10. Biosynthèse des glycérolipides dans la plante supérieure *Arabidopsis thaliana*, la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, et la microalgue brune *Phaeodactylum tricoratum*. La synthèse des acides gras se déroule dans le chloroplaste avant d’être exportés dans le réticulum endoplasmique (RE) pour y être désaturés et allongés. La synthèse des glycolipides (galactolipides MGDG et DGDG, et sulfolipides SQDG) se déroule dans le chloroplaste. La synthèse de l’acyl-SQDG (ASQD) n’est pas connue, mais il est probable qu’elle se déroule également dans le chloroplaste. La synthèse des phospholipides et des bêtaines lipides se déroule dans le RE. Seul le phosphatidylglycérol (PG) peut être synthétisé dans le RE et dans le chloroplaste. Les acides gras polyinsaturés peuvent être transportés du RE au chloroplaste à travers le pool de DAG en utilisant le transporteur TGD. Chez *Arabidopsis thaliana*, les lipides possédant la signature C16 en position *sn*-2 du squelette glycérol, sont synthétisés dans le chloroplaste et suivent la voie « procaryotique », alors que les lipides possédant la signature C18 en position *sn*-2 sont synthétisés dans le RE et suivent la voie « eucaryotique ». Chez *Phaeodactylum tricoratum*, le retour des acides gras allongés du RE au chloroplaste est appelé la voie ω . Les lipides présents chez *Arabidopsis thaliana* sont notés en **vert foncé**, chez *Chlamydomonas reinhardtii* en **vert clair**, et *Phaeodactylum tricoratum* en **marron**. Le chloroplaste d’*Arabidopsis thaliana* et *Chlamydomonas reinhardtii* est entouré par deux membranes (**en vert**), alors que celui de *Phaeodactylum tricoratum* est entouré par quatre membranes (**deux vertes et deux marron en pointillé**). La composition en acides gras de chaque compartiment est écrite en bas de ce dernier. Pour des raisons de clarté, toutes les enzymes impliquées dans la synthèse des lipides ne sont pas placées dans les membranes.

ACC : acetyl-CoA carboxylase, **BTA** : betaine lipid synthase, **CCT** : CTP:phosphocholine cytidyltransferase, **CDP** : cytidine diphosphate, **CDP-Cho** : CDP-choline, **CDP-Etn** : CDP-ethanolamine, **CPT** : CDP-choline:DAG choline phosphotransferase, **CL** : cardiolipine, **CLS** : cardiolipine synthase, **DGAT** : acyl-CoA:DAG acyltransferase, **DGD** : DGDG synthase, **ECT** : CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransferase, **EPT** : CDP-ethanolamine:DAG ethanolamine phosphotransferase, **FATA** : fatty acid thioesterase A/B, **GPAT** : glycerol-3-phosphate acyl transferase, **KAS** : ketoacyl-ACP synthase, **LC-FACS** : long chain acyl-CoA synthetase, **LPAAT** : 1-acyl-glycerol-3-phosphoacyltransferase, **MCMT** : malonyl-CoA:ACP acyltransferase, **MGD** : MGDG synthase, **PAP** : phosphatidic acid phosphatase, **PCho** : phosphocholine, **PCT** : phosphatidic acid cytidyl transferase, **PDH** : pyruvate dehydrogenase, **PEMT** : phosphatidylethanolamine N-transferase, **PEtn** : phosphoethanolamine, **PGS** : phosphatidylglycerol synthase, **PIS** : phosphatidylinositol synthase, **PS** : phosphatidylserine, **PSS1** : PS synthase, **SQD1/2** : SQDG synthases.

1.2.4 Propriétés physicochimiques des glycérolipides

Les lipides possèdent des propriétés physicochimiques qui leur sont propres et qui vont influencer la structure et les propriétés de la membrane. Une étude sur des membranes composées de lipides pures, apporte des réponses sur les propriétés physicochimiques du lipide étudié, et ainsi

aide à la compréhension des propriétés observées pour des membranes complexes, composées de plusieurs lipides.

Une membrane est polarisée du fait de la différence de concentration des ions entre l'intérieur et l'extérieur des compartiments cellulaires. Chez les plantes, il existe des « territoires électrostatiques de membrane » formés par le gradient électrostatique de la membrane plasmique au tonoplaste (membrane autour de la vacuole). Par exemple, la membrane plasmique est plus électronégative alors que les compartiments dérivés du RE sont électriquement neutres (Platre et al., 2018; Simon et al., 2016). Les charges en surface des membranes des compartiments cellulaires jouent un rôle important dans le contrôle de la localisation de nombreuses protéines. Les lipides anioniques sont des régulateurs majeurs des processus fondamentaux cellulaires, comme la signalisation, la division cellulaire, les trafics de membrane, l'expression des gènes, comme le décrivent Noack et Jaillais dans leur revue (Noack and Jaillais, 2020).

Parmi les classes de lipides présentées précédemment, la majorité des phospholipides sont anioniques, dû à la charge négative portée par le groupement phosphate. En revanche, seuls PE et PC sont zwitterioniques par la présence de la charge positive portée par le groupement ammonium qui compense donc la charge négative du phosphate. Alors que les galactolipides (MGDG et DGDG) ne sont pas électriquement chargés, les sulfolipides (SQDG et ASQD) sont négativement chargés dû à la charge portée par le groupe sulfate. Enfin, les bétaines lipides, présents dans les plantes inférieures et les algues, sont zwitterioniques avec la charge négative portée par le groupe carboxyl et la charge positive sur le groupement amine.

En plus de la charge du lipide, l'encombrement stérique de la tête polaire, la longueur et les insaturations des acides gras ont également un rôle essentiel dans la structure de la membrane. La section suivante présente différentes techniques d'analyse pour visualiser l'organisation de la membrane et obtenir des informations importantes comme la taille de la bicouche.

2 Méthodes d'analyses des propriétés physicochimiques des glycérolipides

Les domaines membranaires sont caractérisés par une composition distincte en protéines et/ou lipides. Ces domaines confèrent des propriétés spécifiques à la membrane, conduisant à des structures et des fonctions originales. Les membranes sont qualifiées de mosaïque fluide en référence à l'état de la phase lipidique. Les membranes lipidiques sont capables de s'ajuster en fonction des paramètres environnementaux, afin de maintenir l'homéostasie de la cellule (Martonosi et al., 1985;

Shinitzky, 1984). De plus, les lipides sont capables de former des structures en bicouche, donnant différents types de phases, lamellaires ou cubiques bicontinues, mais également autres que des bicouches, telles que des micelles directes ou inversées, ou des cylindres. Cette section décrit quelques méthodes pour explorer les propriétés physicochimiques des acides gras et des lipides.

2.1 Techniques de visualisation des membranes

C'est en 1855, que les premières descriptions de la membrane plasmique sont faites par Nägeli et Cramer, suite à des observations au microscope optique. Ils décrivent la membrane plasmique comme étant une simple barrière physique capable d'échanger de l'eau entre le cytoplasme et l'extérieur de la cellule (Nägeli and Cramer, 1855). Les scientifiques améliorent leurs connaissances sur les membranes et proposent quelques hypothèses sur leur structure et la présence de protéines autour. L'histoire des découvertes des membranes est très bien décrite dans la revue de Lombard (Lombard, 2014).

Un premier modèle complet de la bicouche a été décrit en 1957 par Fernandez-Moran et Finean, après leurs études sur la gaine de myéline en utilisant les techniques de microscopie électronique et la diffraction de rayons X (Fernández-Morán and Finean, 1957). C'est finalement en 1972 que Singer et Nicolson décrivent le modèle de mosaïque fluide comme étant une bicouche de lipides contenant des protéines plus ou moins ancrées dans cette membrane (Singer and Nicolson, 1972). Ce modèle membranaire devient par la suite le modèle de référence pour les prochaines études sur les membranes. Comparée au passé, la résolution des techniques de visualisation des membranes s'est significativement améliorée. Cette partie présente une liste non-exhaustive de techniques biophysiques couramment utilisées pour déterminer les propriétés biophysiques des membranes.

2.1.1 Technique de microscopie optique, confocale et électronique à transmission

Comme mentionné précédemment, les premières découvertes des membranes plasmiques sont faites à l'aide de microscopes optiques, mais les études plus détaillées de la membrane sont réalisées par microscopie électronique. La résolution des microscopes varie en fonction de la technique utilisée. Par exemple, la résolution de la microscopie optique est de 0,2 μm , alors que pour la Microscopie Electronique à Transmission (MET) elle est autour de 0,1 nm, grâce à l'utilisation des électrons et non des photons.

En microscopie optique, la lumière est dirigée sur un objet plat dont la résolution ne pourrait pas être faite avec les yeux. Par addition d'un laser qui émet à une longueur d'onde spécifique, la microscopie en fluorescence permet de visualiser un colorant fluorescent dans la cellule. Cette technique peut notamment permettre de résoudre la localisation de protéines ou de lipides à l'intérieur de la cellule (Calvez et al., 2019). D'autres techniques couramment utilisées en biologie sont la microscopie confocale et le MET. La première peut analyser des coupes transversales sans aucun impact de la lumière émise en dehors du plan focal. Après reconstitution 3D des plans focaux, l'objet apparaît donc en trois dimensions. La microscopie confocale est souvent couplée à la microscopie de fluorescence. La technique du MET consiste en un objet très fin placé sous un flux d'électrons. Ensuite, la capture électronique est convertie en image. Une reconstruction 3D de l'objet est possible après analyse par microscopie électronique à balayage par faisceau d'ions focalisés (FIB-SEM) où le faisceau d'ions coupe l'objet et le faisceau d'électrons visualise la coupe. Grâce à ces techniques de microscopie, les structures, les sites de contact entre les organelles, la localisation des protéines peuvent être visualisés.

Les études portant sur le chloroplaste sont un exemple d'application utilisant les techniques de microscopie. La structure du chloroplaste a été découverte par Hugo von Mohl par microscopie optique (Staehelin, 2003). Les techniques de microscopie électronique ont été l'outil principal pour la compréhension de l'architecture des thylakoïdes et de leur organisation fonctionnelle. La résolution élevée permet de mesurer la taille des thylakoïdes, de compter le nombre de grana, et de mesurer l'épaisseur du stroma. Aussi, les deux membranes du chloroplaste peuvent être distinguées. En utilisant les reconstructions 3D, les structures à l'intérieur des organelles et les sites de contact entre différents organites peuvent être compris. Plus récemment, grâce à la microscopie confocale à laser, Johnson et ses collaborateurs ont examiné les changements dans la réorganisation structurale des membranes photosynthétiques pendant la mise en place des fonctions de photoprotection (Johnson et al., 2011).

2.1.2 Technique de cryo-microscopie électronique

Le développement de nouvelles techniques de préparation des échantillons et de traitement du signal de plus en plus puissantes, comme en cryo-microscopie électronique (cryo-ME) permet d'établir des structures avec une résolution similaire à celle de la cristallographie aux rayons X, de l'ordre de l'Angström (Å), donc meilleure que les autres techniques de microscopie électronique. Contrairement à la méthode de préparation pour l'analyse par microscopie électronique nécessitant la fixation de l'échantillon dans de la résine, les échantillons analysés par cryo-ME doivent être refroidis

à l'état vitreux avant la visualisation (cryofixés) (Lepault et al., 1985). La cryo-ME est couramment utilisée pour étudier la structure de protéines à l'échelle atomique dans une membrane. Il est donc possible, grâce à cette technique, de déterminer la structure d'une protéine, la lamellarité des liposomes, leur taille, leur forme et leur ultrastructure (Mio and Sato, 2018). Demurtas et ses collaborateurs ont utilisé la cryo-ME pour visualiser et comprendre la structure de la phase cubique des lipides dans un contexte d'applications de systèmes d'administration de médicaments (Demurtas et al., 2015).

2.1.3 Microscopie électronique par cryofracture

La microscopie électronique par cryofracture est une méthode pour l'étude de structures d'échantillons biologiques à petite ou moyenne résolution (20 Å) (Gulik-Krzywicki, 1997). Cette technique est utile pour examiner les structures des lipides, ou l'insertion des protéines dans la membrane. Par exemple, il est possible de distinguer la phase lamellaire de la phase ondulée (*Figure 11*), mais seulement avec des acides gras ordonnés. En effet, avec des chaînes d'acides gras désordonnées, les structures lipidiques ne sont pas bien préservées après congélation. La revue de Meyer et Richter décrit quelques structures avec ou sans protéines (Meyer and Richter, 2001). L'architecture de la membrane cubique a aussi été étudiée par cette technique (Delacroix et al., 1993).

La préparation consiste à congeler très rapidement l'échantillon à très basse température dans de l'azote liquide (-170°C) ou du propane liquide (-200°C). Ensuite, le bloc de glace est fracturé par un choc, toujours à basse température et sous pression. La fracture qui en résulte apparaît le long d'une ligne avec le moins de résistance. Par exemple, pour une cellule ou une vésicule, deux types de fractures existent : (1) la fracture peut apparaître au milieu de la cellule ou de la vésicule, montrant l'intérieur de l'échantillon, ou (2) la fracture sépare la bicouche en deux monocouches, montrant le centre de la membrane. Les protéines ne peuvent pas être coupées et restent intactes (Shechter, 1984).

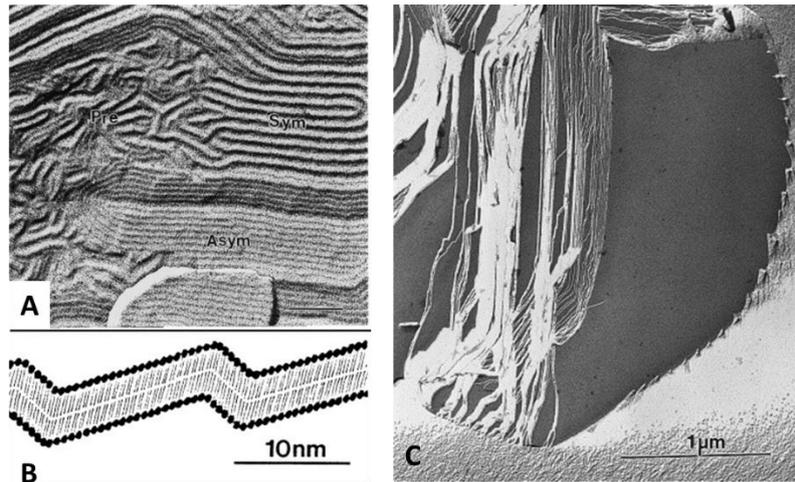


Figure 11. Organisation des membranes lipidiques par cryofracture. **(A)** Formation de différents types de phase ondulée P_{β}' d'une membrane de DPPC. **Pre** : pré-ondulation, **Asym** : ondulation asymétrique, **Sym** : ondulation symétrique. **(B)** Représentation schématique de l'ondulation asymétrique. **(C)** Structure lamellaire cristalline L_{α} des lipides de DMPC en suspension dans l'huile de paraffine. Adaptée de (Meyer and Richter, 2001).

2.1.4 Microscopie à force atomique (AFM)

La technique de microscopie à force atomique (AFM) est un type de microscopie à sonde à balayage à haute résolution, dépendante de la taille de la pointe effilée, généralement de l'ordre du nanomètre. L'AFM génère des images en scannant la surface de l'échantillon à l'aide d'une petite pointe effilée. L'extrémité de la pointe est en contact avec la surface de l'échantillon et transfère le signal en changeant la quantité de lumière laser réfléchiée par la pointe dans une photodiode. L'AFM possède trois capacités majeures : la force de mesure, l'imagerie topographique et la manipulation simple. Il est possible de déterminer la topologie de surface de complexes protéiques dans des membranes hydratées (Johnson et al., 2011; Kirchhoff et al., 2008; Sarkis et al., 2014; Wood et al., 2018). Les organisations du photosystème II (PSII) et du cytochrome b6f ont été obtenues par AFM (Johnson et al., 2014). La technique AFM est principalement utilisée pour résoudre la structure et l'incorporation des protéines dans une membrane, mais progressivement elle sert à étudier l'organisation des lipides (Goksu et al., 2009) (Figure 12).

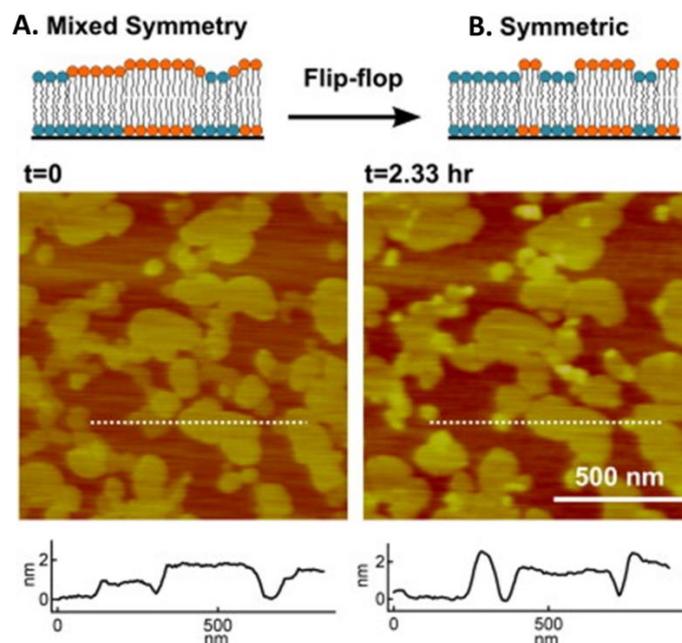


Figure 12. Images AFM sur des membranes supportées de DLPC/DSPC. **(A)** Membrane asymétrique à $t = 0$ min. **(B)** Membrane symétrique à $t = 2,33$ h. L'analyse de sections (**ligne en pointillés**) montre les différentes hauteurs de membranes. D'après (Goksu et al., 2009).

Ainsi, au fil des années, les techniques de visualisation des matériaux biologiques ont évolué, améliorant la résolution. Alors que les microscopes optiques permettaient simplement de visualiser les membranes des différents compartiments cellulaires, la MET, la cryo-ME, la cryofracture et l'AFM peuvent avoir une résolution proche de l'ordre atomique, permettant de distinguer des protéines dans les membranes et de déterminer leur structure.

2.2 Mesure de la température de transition de phase des acides gras

La fluidité de la bicouche lipidique influence de nombreuses fonctions basiques de la membrane. La transition des phases gel à fluide des lipides peut affecter l'activité protéique. En effet, Ray et ses collaborateurs montrent que l'activité de la phospholipase A_2 est principalement impactée par la phase lipidique et moins par la profondeur de son insertion dans la membrane (Ray et al., 2007).

La fluidité membranaire dépend fortement de la composition en lipides dans la bicouche, de la longueur et du degré d'insaturation des acides gras, de la température et de l'état cristal liquide de la phase lipidique. En effet, dans une membrane, les chaînes carbonées peuvent adopter deux états : (1) un état cristallin, ou conformation ordonnée à l'échelle atomique, où les chaînes d'acides gras sont cristallisées, conférant de la rigidité aux membranes. Les phases sont dites « β », appelées gel (L_{β}' , P_{β} , P_{β}'). (2) La phase fluide (L_{α}) est caractérisée par une conformation désordonnée, où les chaînes d'acides

gras sont fondues, et les membranes moins rigides. Une phase gel ondulée, intermédiaire entre la phase gel et fluide, est parfois présente ($P_{\beta'}$) (Figure 13). Les structures des phases sont très bien décrites dans la revue de (Koynova and Tenchov, 2008). La transition de phase de gel à fluide est caractérisée par une température spécifique T_m , dépendante de la longueur et des insaturations des acides gras. A chaînes d'acides gras identiques, la température de transition de phase de deux lipides est impactée par leurs têtes polaires différentes. La température de transition de phase peut être mesurée en utilisant différentes techniques physiques, dont les plus couramment utilisées sont présentées dans cette partie.

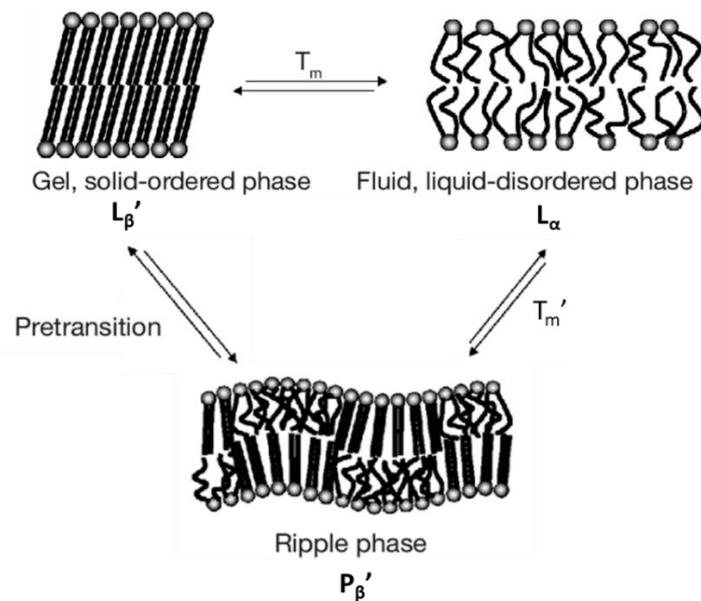


Figure 13. Phases et transition de phase des lipides. Deux phases majeures décrivent la conformation des chaînes carbonées : une phase gel ordonnée ($L_{\beta'}$) et une phase fluide désordonnée (L_{α}). La transition entre ces deux phases est déterminée par la température de transition de phase (T_m). Une phase intermédiaire ondulée peut parfois être détectée ($P_{\beta'}$). D'après (Eeman and Deleu, 2010).

2.2.1 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage (*differential scanning calorimetry* DSC, en anglais) est une technique directe, relativement rapide et non perturbante pour l'étude du comportement thermotrope des dispersions lipidiques hydratées, ou modèle lipidique reconstitué de membranes biologiques (Demetzos, 2008; Lewis et al., 2007). Il s'agit d'une technique thermoanalytique qui mesure et compare la différence d'énergie (chaleur) entre un échantillon et une référence connue. En d'autres termes, la transition entre la conformation gel et la conformation fluide correspond à la fusion des chaînes d'acides gras, conduisant à l'absorption de la chaleur de fusion. Inversement, la transition entre la conformation fluide et la conformation gel est caractérisée par une cristallisation des chaînes d'acides gras, et une libération de chaleur. La DSC mesure cette chaleur absorbée ou libérée.

L'échantillon et la référence sont scellés dans des cuvettes en aluminium et placés dans l'appareil où la température augmente ou diminue à vitesse constante. Sur un thermogramme classique, deux pics majeurs sont visibles : un pic exothermique (correspondant à la fusion des chaînes et une libération de chaleur), et un pic endothermique (correspondant à la cristallisation des chaînes et une absorption de chaleur). Ce résultat veut dire qu'avant la température de fusion, les lipides sont en phase gel, et après le pic de cristallisation, les lipides sont en phase fluide. Dans un système lipide-protéine, la modification de l'aire du pic de DSC indique un changement de conformation de la protéine, altérant la nature des interactions lipides-protéines (McElhane, 1986). La figure suivante montre un thermogramme de DSC du dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, PC 16:0/16:0) (Figure 14).

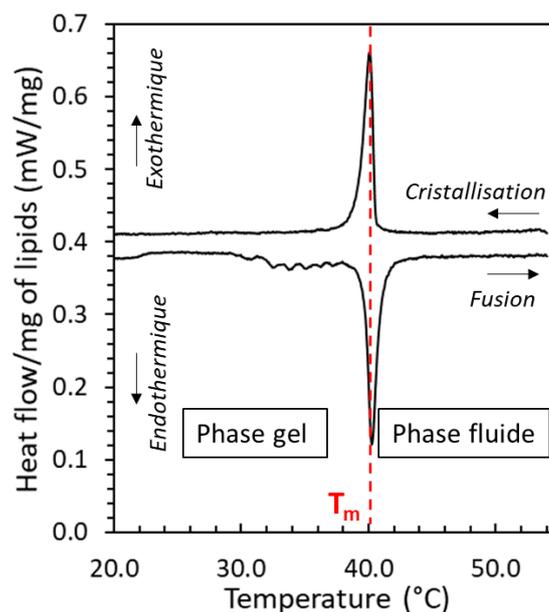


Figure 14. Thermogramme de DSC du lipide DPPC en solution aqueuse. Le thermogramme montre les pics de cristallisation et de fusion des chaînes d'acides gras à la température de transition de phase T_m . La transition entre la phase gel et la phase fluide se fait à 40°C pour le DPPC.

2.3 Résonance magnétique nucléaire à l'état solide (SS-RMN)

La spectroscopie SS-RMN est utilisée pour étudier les dynamiques des lipides dans des modèles membranaires. Deux types de RMN sont utilisés pour l'analyse de lipides : (1) la RMN du phosphore-31 (^{31}P -RMN) donne des informations sur la tête polaire des phospholipides (Dufourc et al., 1992), (2) la RMN du proton ^2H -RMN sur des lipides deutérés donne des informations sur les dynamiques des chaînes d'acides gras (Davis, 1983). La forme du spectre de la ^2H -RMN est différente entre les acides gras en phase gel et en phase fluide. En effet, en phase gel, les acides gras sont droits et très ordonnés donnant un spectre large, alors que les acides gras en phase fluide sont désordonnés, conduisant à un

spectre plus étroit (Furlan et al., 2020). La différence de la valeur du premier moment, M_1 , entre les deux phases, détermine la température de transition de phase (Figure 15). L'influence des acides gras polyinsaturés sur l'organisation de la membrane a été largement étudiée avec cette technique (Shaikh et al., 2015).

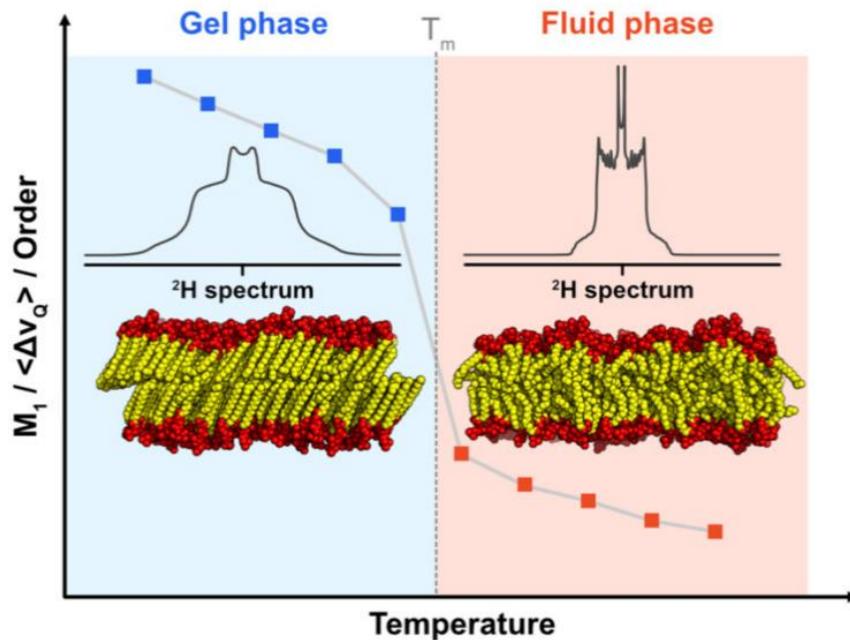


Figure 15. La ^2H -RMN permet de déterminer la température de transition de phase des acides gras. La forme du spectre dépend de la phase des acides gras. Un spectre large correspond à des acides gras ordonnés en phase gel (à gauche), un spectre plus étroit reflète des acides gras désordonnés en phase fluide (à droite). Le changement de valeur du premier moment M_1 indique la température de la transition phase, T_m , entre gel et fluide. D'après (Furlan et al., 2020).

2.3.1 Spectroscopie par résonance de spin électronique (ESR)

La spectroscopie ESR est un outil non destructif qui étudie les dynamiques des membranes. Cette technique donne accès, aux diffusions de rotation et de translation des protéines membranaires et des lipides. Rapidement, l'ESR mesure la transition entre des niveaux d'énergie de spin d'électron. L'échantillon est placé dans un résonateur micro-ondes situé entre deux pôles magnétiques. Le champ magnétique de la molécule étudiée est scanné et la dérivée première de l'absorption du rayonnement micro-ondes est enregistrée. Pour déterminer la transition de phase, le paramètre d'ordre $2A_{\text{par}}$ est tracé en fonction de la température. Par exemple, la figure ci-dessous (Figure 16) montre la prétransition entre les phases gel et ondulée à 28°C , et la transition de phase principale à 40°C pour le lipide DPPC (Páli et al., 1996), valeur identique à celle obtenue par DSC.

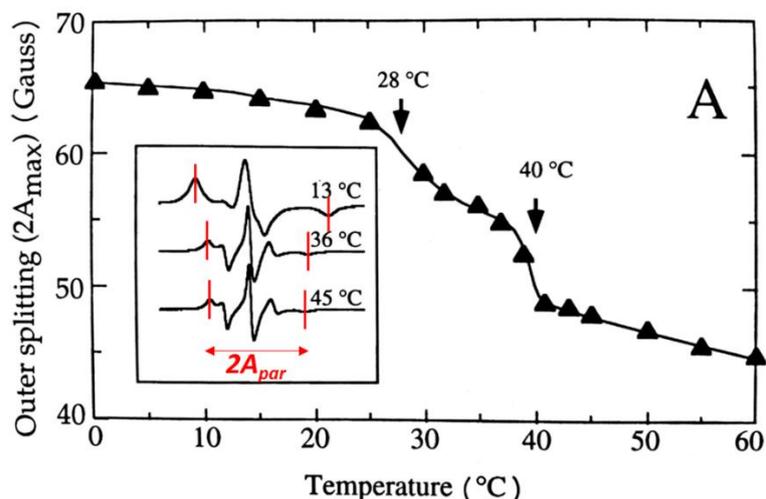


Figure 16. Transition de phase déterminée par la spectroscopie ESR. Le tracé du paramètre $2A_{par}$ en fonction de la température permet de déterminer la température de transition de phase, ici du DPPC. Les flèches indiquent la prétransition de phase (gel à ondulée) à 28°C, et la transition de phase principale à 40°C. Figure adaptée de (Páli et al., 1996).

2.3.2 Anisotropie de fluorescence

Une autre technique classiquement utilisée pour déterminer la température de transition de phase des chaînes d'acides gras est l'anisotropie de fluorescence (Kawski, 1993; van der Meer et al., 1986; van Hoek et al., 1987). Comme exemple d'application de cette technique, Smutzer et Yeagle ont mesuré la température de transition de phase de la membrane de DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine) en ajoutant différentes quantités de déhydroergostérol, une molécule fluorescente de structure similaire au cholestérol. Ils décrivent des domaines riches en stérols grâce à cette molécule (Smutzer and Yeagle, 1985). Les membranes biologiques contiennent des molécules autofluorescentes, comme par exemple les quinones, les dérivés d'acides benzoïques, etc... qui peuvent être utilisées dans des études biochimiques, physiologiques ou d'imagerie (Donaldson, 2020). Différentes techniques d'anisotropie existent, comme l'anisotropie de fluorescence à l'état d'équilibre (*steady-state*) ou résolue en temps (*time-resolved*) (SSFA et TRFA respectivement), excitation de fluorescence (*fluorescence quenching*, FQ) et transfert d'énergie de fluorescence intramoléculaire (IFET) (Esquembre et al., 2007).

Tous les lipides ont leur propre diagramme de phases montrant les températures de transition de phase. Cette température de transition de phase est mesurée par les techniques présentées précédemment. Comme décrit par Koynova et Tenchov, il est important de noter que la longueur des chaînes d'acides gras augmente la température de fusion, alors que la présence d'insaturation diminue la température de transition de phase (Koynova and Tenchov, 2008). La tête polaire des lipides a

également un impact sur la transition de phase. De plus, la température de fusion des chaînes d'acides gras dépend du nombre de groupement méthyl, de la position des insaturations le long de la chaîne carbonée, et de l'environnement comme le pH (Koynova and Tenchov, 2008). La figure suivante montre des exemples de températures de transition de phase de lipides en fonction de leur composition en acides gras et de leur tête polaire (Figure 17).

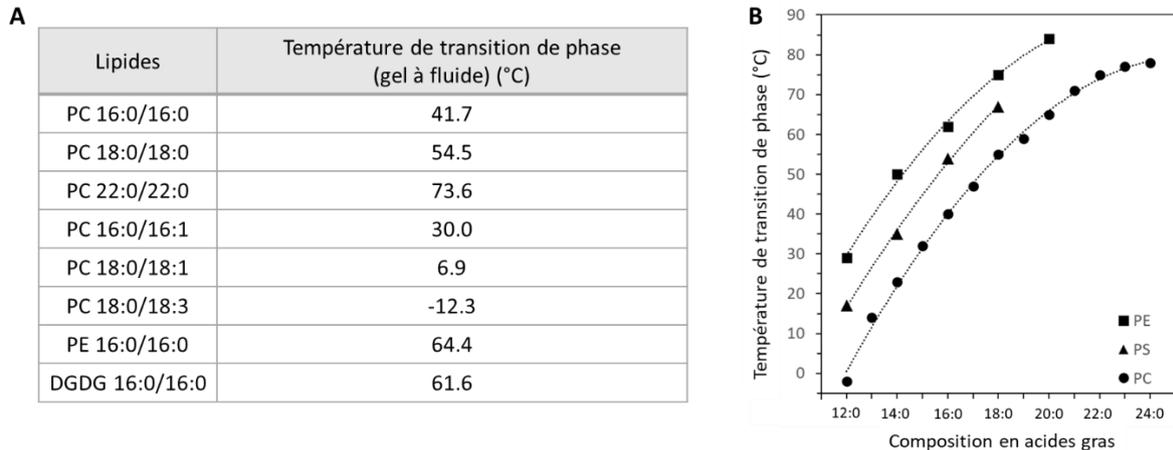


Figure 17. La température de transition de phase est dépendante de la composition en acides gras et de la tête polaire du lipide. La longueur des chaînes d'acides gras augmente la température de fusion, alors que les insaturations la diminuent. La nature de la tête polaire affecte également la température. (A) Température de transition de phase de lipides avec des longueurs différentes d'acide gras, d'après (Koynova and Tenchov, 2008) (B) Influence des chaînes d'acides gras et de la tête polaire sur la température de transition de phase (adapté des données de Avanti Polar Lipids).

2.4 Les membranes : des structures organisées

Comme expliqué précédemment, les chaînes d'acides gras peuvent être solides (phase gel) ou liquides (phase fluide) à l'intérieur des membranes, conduisant à des propriétés biophysiques spécifiques. De plus, les lipides s'auto-assemblent pour limiter les contacts entre les parties hydrophobes et les molécules d'eau du milieu, donnant des structures organisées (Figure 18). Les lipides peuvent adopter une structure composée de bicouches empilées ou non (L_{α}), séparées par une couche d'eau, dont l'épaisseur dépend du système et de sa teneur en eau. Ensuite, les lipides peuvent s'organiser sous forme micellaire sphérique ou allongée en phase hexagonale 2D HI (micelles directes) ou HII (micelles inversées) en fonction de la taille relative de la tête polaire par rapport aux chaînes d'acides gras. Si le volume occupé par la tête polaire est plus grand que le volume occupé par les chaînes d'acides gras, ce qui est majoritairement le cas pour les lysolipides par exemple, la structure tubulaire hexagonale HI est formée, avec les têtes polaires à l'extérieur du tube et les acides gras à l'intérieur. Inversement, si le volume occupé par les têtes polaires est plus petit que celui des acides gras, la courbure est inversée et la phase hexagonale HII est formée avec les têtes polaires à l'intérieur

du tube et les acides gras pointant à l'extérieur. Les lipides formant la phase HII sont parfois capables de passer de la phase HII à la phase lamellaire à travers une phase intermédiaire cubique, en abaissant la température (Tenchov and Koynova, 2012). Toutes les transitions de phase sont spontanées et réversibles (Siegel and Tenchov, 2008). La plupart des membranes biologiques sont proches de la limite de phase ou en équilibre entre les phases L_{α} et HII, permettant la formation de nanodomains HII dans la membrane (Jouhet, 2013). Cette section référence quelques techniques biophysiques utilisées pour l'étude de ces structures lipidiques.

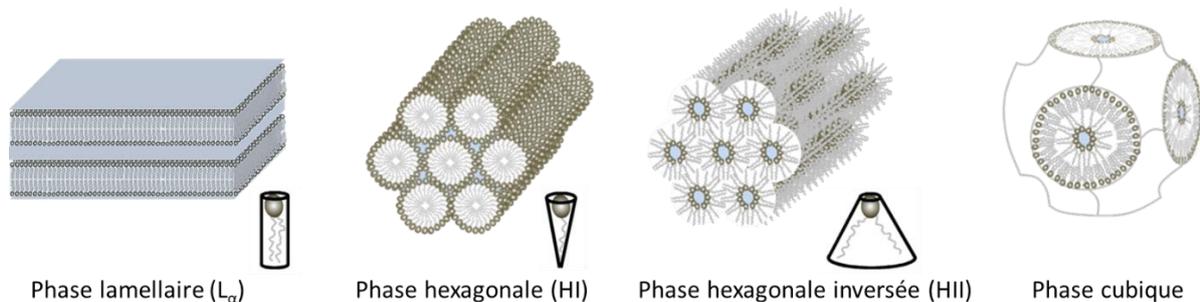


Figure 18. Structures organisées des lipides. Les lipides s'auto-assemblent en différentes structures en fonction de la composition en acides gras, de leur tête polaire, et de la teneur en eau du système. La phase lamellaire (L_{α}) est composée de bicouches empilées séparées par une couche d'eau. La conformation hexagonale HI est formée par des lipides dont la tête polaire occupe plus de place que les chaînes d'acides gras (comme les lysolipides par exemple). Ces lipides forment également des micelles. La phase hexagonale inversée (HII) est adoptée par des lipides coniques dont la tête polaire occupe moins de place que les acides gras (exemple de PE, PA, MGDG). Dans cette structure, les têtes polaires sont à l'intérieur du tube contenant l'eau et les acides gras à l'extérieur. La structure cubique dérive de la structure HII et dépend de la température et de la quantité d'eau. Adaptée de (Jouhet, 2013).

2.4.1 Analyses par diffraction de neutrons et rayons X

La diffraction de rayons X et la diffraction de neutrons sont des techniques similaires, la première utilise un faisceau de rayons X, et la seconde un faisceau de neutrons. Les deux techniques donnent des informations sur l'organisation de la membrane, les épaisseurs de membranes et de couches d'eau, et la rigidité de courbure. Les échantillons sont placés dans un faisceau de neutrons thermiques ou froids pour obtenir un cliché de diffraction donnant des informations sur la structure du matériel. Dû à leurs différentes propriétés de diffusion, les neutrons et les rayons X donnent des informations complémentaires : les rayons X conviennent à l'analyse superficielle d'un échantillon, les rayons X puissants produits par le rayonnement synchrotron conviennent aux faibles profondeurs ou aux échantillons minces, alors que les neutrons, ayant une profondeur de pénétration plus élevée, sont capables d'analyser des échantillons plus épais.

Comme la DSC, la diffraction de rayons X et de neutrons permet aussi de déterminer les transitions de phases des lipides. Avec les rayons X, un pic de diffraction large autour de 0,46 nm

caractérise les acides gras désordonnés, alors que les acides gras ordonnés sont caractérisés par un pic de diffraction fin à 0,42 nm (Finean and Hutchinson, 1988; Quinn and Lis, 1991). Un tracé de la position du pic de diffraction du lipide en fonction de la température montre la température de transition de phase du lipide concerné ou du système étudié. De nombreuses études rapportent les caractéristiques d'une membrane de lécithine, comme la conformation des chaînes d'acides gras et la température de transition de phase, en utilisant la diffraction des rayons X (Janiak et al., 1979; Tardieu et al., 1973). Ces paramètres déterminés sur des membranes de lécithine synthétique permettent d'anticiper les comportements structurels des lipides naturels ou d'autres classes de lipides.

Dans un premier temps, l'organisation des lipides seuls a pu être déterminée grâce à la diffraction de neutrons. Pour les phospholipides, la tête polaire du PA et du PE étant petite comparée au volume des acides gras, ils s'organisent spontanément en phase hexagonale inverse (HII), tout comme le DPG et le PS. En revanche, PC, PG et PI forment des phases lamellaires de bicouches. Des études plus précises sont réalisées pour déterminer l'orientation des têtes polaires dans la membrane. C'est le cas de l'étude du PI par l'équipe de Bradshaw, car ce lipide est reconnu par de nombreuses enzymes. Ils concluent que la tête polaire inositol est perpendiculaire à la surface de la membrane (Bradshaw et al., 1996). Pour les glycolipides, la tête polaire du MGDG étant plus petite que le volume occupé par les acides gras, ce lipide s'organise spontanément en phase HII. DGDG et SQDG, au contraire, ont une tête polaire plus volumineuse, favorisant l'organisation lamellaire des lipides. De nombreuses études ont été menées pour comprendre l'organisation et le rôle des galactolipides dans la membrane. Par exemple, il a été montré que l'architecture de la membrane des thylakoïdes dépend principalement du ratio MGDG/DGDG. Le DGDG est important pour le maintien de l'organisation lamellaire (Demé et al., 2014). Une autre étude montre l'influence du DGDG sur l'accolement des membranes en comparaison avec PC (Kanduč et al., 2017). La position de la tête polaire du DGDG est également résolue par la diffraction de neutrons. Il a été montré qu'elle est orientée parallèlement au plan de la bicouche de telle sorte que les motifs sucrés soient serrés à la surface de la membrane en une couche polaire de 0,8 nm d'épaisseur (McDaniel, 1988). Cependant, les propriétés du SQDG et de l'ASQD dans la membrane n'ont pas encore été étudiées.

La structure de membranes plus complexes peut être résolue avec ces techniques, et des hypothèses sur le rôle des lipides dans la membrane peuvent ainsi être formulées. En effet, les propriétés d'une membrane dépendent de la concentration de chaque classe de lipides, conduisant à des structures de membranes différentes (Luzzati and Husson, 1962). Par exemple, un mélange de lipides identique à la composition des membranes des thylakoïdes, à savoir MGDG/DGDG/PG/SQDG, s'auto-organise en phase HII à faible humidité et en phase lamellaire à forte humidité comme le montre les clichés de diffraction de neutrons suivants (*Figure 19*) (Demé et al., 2014).

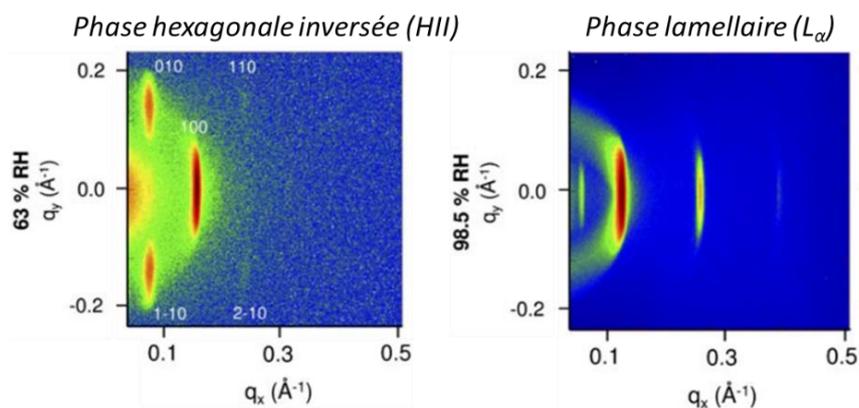


Figure 19. Clichés de diffraction de neutrons montrant la structure d'une membrane composée des lipides de thylakoïde. La composition de la membrane reconstituée est MGDG/DGDG/PG/SQDG 100/48/17/17 (mol %). A faible humidité (**gauche**), les lipides s'organisent en phase hexagonale inversée HII, alors qu'à forte humidité (**droite**), la phase lamellaire est détectée. Adaptée de (Demé et al., 2014).

Un avantage majeur de la diffraction de neutrons par rapport à la diffraction des rayons X est que cette dernière technique est sensible à la substitution isotopique des noyaux d'hydrogène natifs (^1H) des molécules biologiques, par leur isotope ^2H (deutérium D) qui est un puissant diffuseur des neutrons en cohérence. En utilisant un solvant de contraste à 8 % D_2O (92 % H_2O), l'épaisseur de la membrane et de la couche d'eau peuvent être calculées à partir du profil de densité de longueur de diffusion des neutrons (*neutron scattering length density* NSLD en anglais) (Kučerka et al., 2009). Plus d'explications sur cette méthode seront données dans la partie matériel et méthode de ce rapport.

2.4.2 La compressibilité de la membrane

La compressibilité de la membrane peut être évaluée en regardant les profils des pics de Bragg (pics de diffraction quand la loi de Bragg est respectée) sur un cliché de diffraction de neutrons, à partir duquel la rigidité de courbure et le module de compression de la membrane peuvent être extraits. Ces deux paramètres donnent des informations sur les propriétés physiques de la membrane, en particulier sur la capacité d'un empilement de bicouches à être comprimé ou courbé.

L'étude de monocouches de lipides dans une cuve de Langmuir donne également des informations sur la compressibilité de la membrane. De nombreuses études utilisent cette technique pour voir l'impact de l'addition d'une protéine ou d'une classe de lipides dans une monocouche. Par exemple, Phan et Shin ont étudié l'effet de la cardiolipine sur la morphologie de la membrane. Ils ont conclu que l'addition de la cardiolipine augmente l'élasticité de la membrane (Phan and Shin, 2015). Nintenberg et ses collaborateurs donnent un aperçu sur le mécanisme de réaction et les propriétés de liaison de MGD1, l'enzyme responsable de la synthèse des MGDG, lipide majeur des membranes

photosynthétiques. Dans cet article, les auteurs ont pour objectif de comprendre le rôle du PG dans la liaison à MGD1. En effet, une membrane de PG, comme les membranes de MGDG, a une forte affinité pour MGD1. Inversement, une membrane de DGDG a un effet négatif et tend à exclure la protéine (Nitenberg et al., 2020). La composition de la membrane est donc cruciale pour la liaison des protéines et leurs activités.

2.4.3 Simulations de membranes par dynamique moléculaire

Un dernier outil présenté ici pour l'étude des membranes, est une technique de simulation numérique. En effet, les membranes peuvent être modélisées et leur organisation simulée en utilisant les méthodes de simulation de dynamique moléculaire. La simulation des charges répulsives et attractives, les mouvements physiques des atomes et des molécules sont générés *in silico*. Une capture instantanée à l'équilibre du système donne des informations sur la tête polaire des lipides et sur l'orientation des molécules d'eau entre les bicouches. Cette méthode est souvent utilisée en parallèle des autres techniques physiques citées précédemment. En effet, d'une part elle permet de confirmer ou non les hypothèses et d'apporter des informations supplémentaires aux techniques de diffraction, mais d'autre part, la simulation permet de prédire les comportements des lipides dans les membranes plus rapidement, avant de réaliser les expériences sur les grands instruments. Par exemple, les simulations de dynamique moléculaire sur des membranes de PC et DGDG ont confirmé l'organisation lamellaire de ces deux lipides et permettent de calculer les forces attractives entre les bicouches adjacentes. Il a été montré que les bicouches de DGDG sont six fois plus attractives que les bicouches de PC (Kanduč et al., 2017).

D'autres techniques physiques sont disponibles pour l'étude des lipides membranaires mais non référencées ici, comme par exemple la diffusion aux petits angles des neutrons ou des rayons X (SANS et SAXS), la réflectométrie, ou le dichroïsme circulaire, permettant d'étudier l'insertion des protéines dans la membrane.

Pour conclure sur cette introduction, la carence de phosphate chez les plantes et les microalgues, entraîne un remaniement de la composition en lipides de la cellule. Il est observé dans de nombreuses données de la littérature que la quantité de phospholipides diminue alors que la quantité de lipides non-phosphorés augmente. En particulier, il est noté un lien entre la quantité de PG et de SQDG, et de PC et DGDG chez les plantes, et chez les microalgues, les bétaines lipides (DGTS,

DGTA) semblent remplacer la PC. De plus, les microalgues sont encore méconnues et offrent une diversité lipidique non présente chez les plantes, comme par exemple la présence de l'ASQD et des longues chaînes d'acides gras polyinsaturées est notée.

Ce travail de thèse a donc pour objectif de répondre aux questions suivantes : chez les organismes en carence de phosphate, le remplacement des phospholipides par des lipides non-phosphorés est-il guidé par un remplacement structural des lipides ? En d'autres termes, existe-t-il un lien entre les propriétés des lipides échangés ? Les propriétés structurales du PG et du SQDG sont-elles identiques, favorisant leur interchangeabilité ? Il en est de même pour la PC et le DGDG et la PC et les bêtaines lipides. Enfin, quel est le bénéfice des lipides particuliers chez les microalgues dans l'architecture des membranes ? Pour répondre à ces questions, chaque étude réalisée traite d'un remplacement lipidique. La première partie de ce rapport de thèse est consacrée aux lipides des microalgues *Phaeodactylum tricornutum* et *Microchloropsis gaditana*, et la deuxième partie est focalisée sur les échanges des lipides de la plante *Arabidopsis thaliana*.

Matériels et méthodes

1 Organismes d'étude et méthodes de culture

1.1 La plante *Arabidopsis thaliana*

1.1.1 La souche Col-0

Les analyses ont été effectuées sur l'écotype Columbia Col0 d'*Arabidopsis thaliana* comme souche sauvage.

1.1.2 Condition de culture d'*Arabidopsis thaliana*

Les plantules d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivées en phytotron, dans des pots individuels de terre dans le but de réaliser une extraction de lipides à partir des feuilles. Les conditions utilisées permettent une production optimale de feuilles. D'abord une culture en photopériode de jours longs 16 h/8 h jour/nuit est faite pendant 15 jours, avant de passer les plantes en photopériode de jours courts 8 h/16 h jour/nuit pendant 5 à 6 semaines. La température a été contrôlée et fixée à 22°C le jour et 16°C la nuit. La quantité de lumière était de 120 et 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivement pour les jours longs et courts. L'hygrométrie de la pièce a été mesurée à 60 %. Après 6 semaines de culture, les feuilles ont été récoltées et immédiatement congelées dans de l'azote liquide, avant d'être stockées à -80°C pour être analysées ultérieurement.

1.2 La diatomée *Phaeodactylum tricornutum*

1.2.1 La souche Pt1 8.6

La souche sauvage de *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897) utilisée est l'écotype Pt1 (souche 8.6, CCAP 1055/3 ou CCMP2561) obtenue de la collection du NCMA (National Center for Marine Algae and Microbiota, Etats-Unis).

1.2.2 Milieu de culture ESAW et conditions de culture

La souche sauvage est maintenue en culture liquide, dans le but de réaliser des extractions de lipides, dans un milieu d'eau de mer artificiel ESAW (*Enrichment Solution with Artificial Water*) (Berges et al., 2001) non carencé (*Table 2*). Dans des conditions optimales de croissance, les cellules sont cultivées dans milieu ESAW enrichi contenant 10 fois plus de NaNO_3 et $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ESAW 10N10P), correspondant à une concentration de 5,49 mM et 0,22 mM respectivement, (Abida et al., 2015).

Les cultures sont réalisées dans 50 mL de milieu de culture dans des erlenmeyers 250-mL, pour optimiser l’oxygénation des cellules, et placées dans un incubateur (Infors HT Multitron pro) à 20°C, avec une agitation à 100 rpm, avec une photopériode de 12 h/12 h jour/nuit et une intensité lumineuse de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

1.3 L’eustigmatophyte *Microchloropsis gaditana*

1.3.1 La souche CCMP526

Toutes les expérimentations de ce projet ont été réalisées avec la souche *Microchloropsis gaditana* sauvage (Fawley et al., 2015), (souche CCMP526 ou NO1), obtenue de la collection du NCMA (National Center for Marine Algae and Microbiota, Etats-Unis).

1.3.2 Milieux de culture F/2 et conditions de culture

La souche sauvage est maintenue en culture composée d’eau de mer artificiel F/2, non carencé (Table 2) (Guillard and Ryther, 1962) pour réaliser des extractions de lipides et des transformations génétiques. Les cultures liquides sont réalisées dans 1/5 du volume total de l’erlenmeyer pour optimiser l’oxygénation des cellules, et conservées dans des incubateurs (Infors HT Multitron pro) à 20°C, avec une agitation à 100 rpm, et une photopériode de 24 h jour et une intensité lumineuse de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Des boîtes stériles contenant 20 mL de milieu gélosé F/2 agar 1 % (m/v) (Sigma) sont également utilisées avec ajout d’antibiotiques : carbénicilline à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ROTH) pour s’affranchir des contaminations bactériennes potentielles dans toutes les boîtes, et zéocine à 7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Invitrogen) seulement pour les milieux sélectifs après transformations. Les cultures sur milieux gélosés sont placées dans un incubateur vertical 294-L (MLR-352-PE, PHCBI) à 20°C, en lumière continue avec une intensité lumineuse de 55 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Table 2. Composition des milieux ESAW et F/2 pour la culture de *Phaeodactylum tricornutum* et *Microchloropsis gaditana*. De l'eau milli-Q est utilisée pour dissoudre les composés. Les solutions de sels et les nutriments sont stérilisés à l'autoclave. Toutes les préparations sont filtrées à 0,22 µm avant mélange. †(Guillard, 1975; Guillard and Ryther, 1962).

Solution de sel 1	Pour 1 L de solution ESAW 1N1P		Pour 1 L de solution F/2 1N1P	
	Concentration finale		Concentration finale	
NaCl	21,194 g.L ⁻¹	362,7 mM	21,194 g.L ⁻¹	362,7 mM
Na ₂ SO ₄	3,550 g.L ⁻¹	24,9 mM	3,550 g.L ⁻¹	24,9 mM
KCl	0,599 g.L ⁻¹	8,03 mM	0,599 g.L ⁻¹	8,03 mM
NaHCO ₃	0,174 g.L ⁻¹	2,07 mM	0,174 g.L ⁻¹	2,07 mM
KBr	0,0863 g.L ⁻¹	0,725 mM	0,0863 g.L ⁻¹	0,725 mM
H ₃ BO ₃	0,023 g.L ⁻¹	0,372 mM	0,023 g.L ⁻¹	0,372 mM
NaF	0,0028 g.L ⁻¹	0,0667 mM	0,0028 g.L ⁻¹	0,0667 mM
Solution de sel 2	Concentration finale		Concentration finale	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,592 g.L ⁻¹	47,18 mM	9,592 g.L ⁻¹	47,18 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,344 g.L ⁻¹	9,14 mM	1,344 g.L ⁻¹	9,14 mM
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,0218 g.L ⁻¹	0,082 mM	0,0218 g.L ⁻¹	0,082 mM
Nutriments majeurs	Concentration finale		Concentration finale	
NaNO ₃ (N)	46,67 mg.L ⁻¹	0,549 mM	Guillard's (F/2) Marine Water Enrichment Solution† (Sigma-Aldrich) 1X	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (P)	3,094 mg.L ⁻¹	0,022 mM		
Métaux (trace)	Concentration finale		Concentration finale	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3,09 mg.L ⁻¹	8,3 µM	Guillard's (F/2) Marine Water Enrichment Solution† (Sigma-Aldrich) 1X	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	73 µg.L ⁻¹	2,54 µM		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	16 µg.L ⁻¹	0,0672 µM		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	540 µg.L ⁻¹	2,73 µM		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,48 µg.L ⁻¹	6,12 µM		
Na ₂ SeO ₃	0,173 µg.L ⁻¹	1 nM		
NiCl ₂ ·6H ₂ O	1,49 µg.L ⁻¹	6,27 nM		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9,8 µg.L ⁻¹	0,039 µM		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	-		
Fe-EDTA	3 mg.L ⁻¹	8,17 µM		
Vitamines	Concentration finale		Concentration finale	
Vitamine H (Biotine)	1 µg.L ⁻¹	4,1 nM	Guillard's (F/2) Marine Water Enrichment Solution† (Sigma-Aldrich) 1X	
Vitamine B12 (Cyanobalamine)	1 µg.L ⁻¹	0,738 nM		
Vitamine B1 (Thiamine HCl)	0,2 mg.L ⁻¹	0,593 µM		

1.4 La bactérie compétente *Escherichia coli* DH5α

1.4.1 La souche de *Escherichia coli* DH5α

Les transformations sont réalisées sur des bactéries compétente *Escherichia coli* DH5α (MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Invitrogen) portant le génotype $F \varphi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k^-, m_k^+) phoA supE44 \lambda^- thi^-1 gyrA96 relA1$. Les mutations *recA1* (mutation ponctuelle remplaçant la glycine par l'acide aspartique en position 160 inactivant la recombinaison homologue) et *endA1* (inactivant une endonucléase intracellulaire empêchant la dégradation du futur plasmide inséré) augmentent la stabilité des inserts d'ADN et améliorent la qualité de l'ADN plasmidique préparé à partir de minipreps. La mutation *lacZM15* permet la détection de bactéries recombinantes lors de clonages moléculaires grâce à la propriété d'α-complémentation de la β-galactosidase (Ullmann et al., 1967). Les bactéries sont conservées en aliquot de 100 µL à -80°C.

1.4.2 Milieux de culture de *Escherichia coli*

Escherichia coli est cultivée en milieu liquide LB Lennox (bouillon de lysogénie, ROTH) à 37°C sous agitation à 180 rpm (Minitron, Infors HT), ou en boîtes stériles sur 20 mL de milieu gélosé LB agar 20 g/L (ROTH) dans une étuve maintenue à 37°C. Un antibiotique adapté est ajouté au milieu gélosé pour la sélection des bactéries transformantes (Table 3).

Table 3. Antibiotiques de sélection spécifiques pour la sélection des bactéries après transformation.

Enzyme ciblée	Numéro d'accès	Antibiotique de résistance	Formule	Fournisseur	Concentration antibiotique
PEAMT (Phosphoéthanolamine N-méthyltransférase)	Naga_100219g4	Kanamycine	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	ROTH	50 µg.mL ⁻¹ (9 mM)
	Naga_100005g102	Carbénicilline	$C_{17}H_{16}N_2O_6S \cdot 2Na$	ROTH	100 µg.mL ⁻¹ (240 mM)
BTA-like (DGTS synthase)	Naga_100016g36	Spectinomycine	$C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl \cdot 5H_2O$	PanReac AppliChem	50 µg.mL ⁻¹ (100 mM)
PGPS (CDP-diacylglycérol-glycérol-3-phosphate 3-phosphatidyltransférase)	Naga_100081g13	Kanamycine	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	ROTH	50 µg.mL ⁻¹ (9 mM)
SQD2 (UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransférase)	Naga_100208g9	Kanamycine	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	ROTH	50 µg.mL ⁻¹ (9 mM)
	Naga_100008g19	Spectinomycine	$C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl \cdot 5H_2O$	PanReac AppliChem	50 µg.mL ⁻¹ (100 mM)
	Naga_100010g28	Kanamycine	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	ROTH	50 µg.mL ⁻¹ (9 mM)

2 Méthodes de biologie moléculaire

2.1 Préparation de l'insert pour la transformation de *Microchloropsis gaditana*

2.1.1 Transformation de *Escherichia coli* DH5α

La transformation de *Escherichia coli* DH5α est faite par choc thermique. 10 ng de plasmides contenant l'insert d'intérêt pour la transformation de *Microchloropsis gaditana* est ajouté à l'aliquot de 100 µL de bactéries, le tout est ensuite incubé 30 min sur la glace. Le choc thermique est réalisé à 42°C pendant 40 sec, puis 2 min dans la glace. 1 mL de bouillon de lysogénie (LB Lennox, ROTH) sont ajoutés, et le mélange est laissé 1h à 37°C à 180 rpm (Minitron, Infors HT). 10 % du volume est étalé sur une boîte LB agar (ROTH) à 20 g/L avec un antibiotique de résistance, permettant de sélectionner les bactéries transformées (Table 3). Le reste des bactéries est centrifugé 3 min à 3 000 x g. Le surnageant est jeté, et les bactéries sont resuspendues dans le liquide restant au fond du tube et étalées sur une seconde boîte de sélection. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant une nuit pour faire pousser les colonies résistantes ayant reçues le plasmide. Les boîtes peuvent ensuite être stockées à 4°C.

2.1.2 Extraction du plasmide des bactéries

Après transformation des bactéries, une colonie résistante à l'antibiotique est ensemencée dans 5 mL de LB liquide avec l'antibiotique de résistance. La culture bactérienne est incubée environ 8 h à 37°C à 180 rpm, puis transvasée en flasque dans 100 mL de LB avec l'antibiotique de résistance et laissée à 37°C à 180 rpm toute la nuit.

Les plasmides sont extraits par Midi-Prep en utilisant le kit et le protocole donnés par le fournisseur (Macherey-Nagel). Les cultures bactériennes sont centrifugées 10 min à 5 000 x g, puis le surnageant est jeté. Les filtres et les colonnes de silice sont équilibrés avec 12 mL de tampon EQU (2-propanol 10–15 %) en imbibant le bord du filtre. Les bactéries sont resuspendues dans 8 mL de tampon RES (composition non fournie par le fournisseur), puis lysées avec 8 mL de tampon LYS (solution d'hydroxyde de sodium 0.5–1.0 %) pendant 5 min à température ambiante. La réaction est neutralisée en ajoutant 8 mL de tampon NEU (acétate de potassium) permettant de transformer le SDS en KDS. La couleur bleue du tampon de lyse disparaît. Le lysat est filtré petit à petit, et le filtre peut être rincé avec le tampon EQU pour décrocher les restes de lysat des bords du filtre. Le filtre est jeté et la colonne lavée avec 8 mL de tampon WASH (éthanol 5–20 %). L'élution des plasmides est faite avec 5 mL de

tampon ELU (forte teneur en sel) et l'éluât est directement récupéré dans 3,5 mL d'isopropanol (-20°C), puis stocké à -20°C pendant 2 h pour la précipitation de l'ADN. Le tube est centrifugé 30 min à 5 000 x g. Le surnageant est jeté et le culot d'ADN est repris dans 2 mL d'éthanol 70 %, puis centrifugé 30 min à 5 000 x g. Le surnageant est retiré au maximum, et le culot d'ADN est séché sous sorbonne. L'ADN est resuspendu dans 100 µL d'H₂O milli-Q stérile puis dosé au spectrophotomètre (Nanodrop 2000, ThermoScientific).

2.1.3 Linéarisation du plasmide

Le plasmide est linéarisé par digestion enzymatique pour séparer l'insert d'intérêt (*Table 4*). La compatibilité de tampon et de température d'activité des enzymes sont vérifiées (NEBcloner). Les enzymes utilisées sont toutes à haute-fidélité (HF). 10 µg de plasmide sont digérés avec 2 µL de chaque enzyme de restriction dans du tampon CutSmart® 1X (NEB). Le mélange est complété avec de l'H₂O milli-Q stérile pour un volume final de 250 µL. La digestion est réalisée à la température de travail des enzymes (ici 37°C) pendant 3 h.

Table 4. Enzymes de restriction choisies pour chaque plasmide et taille des fragments attendus après digestion.

Cible	Plasmide	Enzymes de restriction			Taille fragments (pb)		
		E1	E2	E3	E1-E2	E1-E3	E2-E3
PEAMT	pMK_4	SpeI-HF	BamHI-HF	PstI-HF	3311	1608	676
	pMA_102	BamHI-HF	EcoRI-HF	ScaI-HF	3311	1542	805
DGTS syntase	pMS_36	NheI-HF	SpeI-HF	EcoRV-HF	3311	1408	1108
PGPS	pMK_13	BamHI-HF	EcoRI-HF	PstI-HF	3311	1608	676
SQD2	pMK_9	NheI-HF	SpeI-HF	PstI-HF	3311	1608	676
	pMS_19	BamHI-HF	SpeI-HF	PstI-HF	3311	1464	1036
	pMK_28	NheI-HF	EcoRI-HF	AgeI-HF	3311	1565	719

2.2 Amplification, séparation et purification de fragments d'ADN

2.2.1 Amplification par PCR sur colonies de *Microchloropsis gaditana*

L'amplification d'un fragment d'ADN par amplification en chaîne par polymérase (PCR) directement sur colonies, en utilisant le kit PHIRE™ Plant Direct PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific). Le mix contient l'ADN polymérase Phire Hot Start II, les nucléotides (dNTP), un tampon de charge de couleur verte et 1,5 mM de MgCl₂. Chaque réaction PCR est composée de 12,5 µL PHIRE™ Mix 2X, 1,25 µL des deux primers 10 µM (*Table 7*), 2,5 µL de cellules et de l'eau sans nucléase (Thermo Scientific) qsp 25 µL.

La PCR est réalisée en 40 cycles optimisés pour réduire l'apparition de bandes aspécifiques par un thermocycleur (Thermal cycler T100, BioRAD). L'ADN est dénaturé à 98°C pendant 5 min au préalable. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 98°C pendant 10 sec, une étape d'hybridation entre 60 et 65°C pendant 10 sec et une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min. Au cours des 40 cycles, la température d'hybridation est modifiée de la façon suivante : 3 cycles à 65°C, 3 cycles à 64°C, 3 cycles à 63°C, 3 cycles à 62°C et 28 cycles à 60°C. La séquence se termine par une élongation à 72°C pendant 2 min. Le produit de PCR peut être conservé à -20°C.

2.2.2 Séparation sur gel d'agarose

2.2.2.1 Pour un produit de digestion

Le produit de digestion est chargé avec 50 µL de tampon de charge bleu 6X (0,25 % (m/v) bleu de bromophénol, 0,25 % (m/v) xylène cyanol, 30 % (m/v) glycérol dans de l'H₂O milli-Q stérile), puis migré sur gel d'agarose 0,8 % (m/v) (ROTH) dans du TAE 0,5X (Tris, Acétate, EDTA) / Sybr® Safe 1X (Invitrogen). Le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec) est utilisé comme référence de poids moléculaire. La migration est faite à 100 V pendant 30 min. Une capture du gel après migration est réalisée en UV par un GelDoc (XR+, BioRAD).

2.2.2.2 Pour une amplification par PCR

Après amplification, le produit de PCR est séparé sur gel d'agarose 1 % (m/v) (ROTH) dans du TAE 0,5X (Tris, Acétate, EDTA) / Sybr® Safe 1X (Invitrogen). Le tampon de charge vert de l'ADN est déjà présent dans le mix Phire™ Plant. Le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec) est utilisé comme référence de poids moléculaire. La migration est faite à 100 V pendant 30 min. Une capture du gel après migration est réalisée en UV par un GelDoc (XR+, BioRAD).

2.2.3 Extraction d'ADN sur gel d'agarose

L'extraction d'ADN à partir de gel d'agarose est réalisée en utilisant le kit et le protocole donné par les fournisseurs (Macherey-Nagel). La bande de gel correspondant au fragment d'ADN souhaité est découpée du reste du gel d'agarose à l'aide d'une lame de scalpel stérile, puis placée dans un tube de 2-mL stérile préalablement taré. Le tampon de dissolution NTI (guanidium thiocyanate 30-45 %) est ajouté à hauteur de 200 µL pour 100 mg d'agarose. Les échantillons sont incubés 5 à 10 min à 50°C en

agitant régulièrement, jusqu'à dissolution complète du gel. La solution est chargée sur la colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (700-µL) montée sur un tube de collection 2-mL, puis centrifugée 30 sec à 11 000 x g. Le filtrat est jeté avant de laver la membrane de silice avec 700 µL de tampon NT3 (contenant de l'éthanol 96-100 %). L'échantillon est centrifugé 30 sec à 11 000 x g, et l'étape est répétée pour éliminer un maximum de sels chaotropiques apportés par le tampon NTI. La membrane de silice est ensuite séchée par centrifugation pendant 1 min à 11 000 x g, en ayant jeté le filtrat au préalable. Il est également possible de chauffer les échantillons à 70°C pendant 2 à 5 min pour évaporer tout l'éthanol avant l'étape d'élution. Pour cette étape, le tube de collection est remplacé par un tube de 1,5-mL stérile. L'élution n'est pas faite avec le tampon d'élution NE (5 mMTris/HCl) fourni dans le kit, mais est faite avec 2 fois 30 µL d'H₂O milli-Q stérile et le tube est incubé à 65°C pendant 5 à 10 min puis centrifugé 1 min à 11 000 x g entre chaque étape. L'ADN est dosé au spectrophotomètre (Nanodrop 2000, ThermoScientific).

2.2.4 Concentration d'ADN par précipitation

La précipitation de l'ADN est réalisée en ajoutant dans le tube contenant l'ADN, 1/10^{ième} (v/v) d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2), 2 volumes d'éthanol 100 % froid et 10 µg de glycogène. Le mélange est stocké à -20°C, pendant 2 h minimum, puis est centrifugé 30 min à 20 000 x g à -4°C. Le surnageant est jeté, et le culot d'ADN est lavé avec 300 µL d'éthanol 70 % froid, puis centrifugé 5 min à 20 000 x g à -4°C. Le surnageant est retiré au maximum à l'aide d'une pipette, et le culot est séché sous hotte pour faire évaporer l'éthanol, avant d'être resuspendu avec 17 µL d'H₂O milli-Q stérile. L'ADN est dosé au spectrophotomètre (Nanodrop 2000, ThermoScientific). L'ADN extrait peut être stocké à -20°C.

2.3 Séquençage d'un fragment d'ADN

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR et extraits du gel d'agarose sont envoyés en séquençage chez Macrogen (Macrogen Europe, Amsterdam, Pays-Bas). Le service Ez-Seq (Premix) est utilisé, c'est-à-dire que le primer utilisé pour le séquençage est envoyé dans le même tube que l'échantillon à séquencer. 10 µL totaux sont envoyés, composés de 5 µL du fragment d'ADN et 5 µL de primer à 10 µM (Table 7). Un primer est choisi tous les 700 pb (paire de bases) environ pour couvrir toute la séquence dans le cas d'un long fragment. Les chromatogrammes obtenus permettent de vérifier la pureté du fragment d'ADN. Un alignement de séquence séquencée avec la séquence souhaitée est ensuite réalisé avec le logiciel MultAlin (INRA) (Corpet, 1988).

3 Transformation des microalgues

3.1 Transformation de *Phaeodactylum tricornutum* par CRISPR-cas9

La technique de CRISPR-cas9 est un outil d'édition de génome (*genome editing* en anglais) par coupure du double brin d'ADN à un endroit précis dans le génome. Les systèmes de répartition de la cellule vont ensuite recoller les deux morceaux de l'ADN, avec des erreurs possibles (délétion, insertion de nucléotides), rendant le gène ciblé inactif.

7 gènes étaient initialement ciblés individuellement par la technologie de CRISPR-cas9. Cette partie du projet n'a pas pu être réalisée. Les numéros d'accès sont présentés dans la *Table 5*. Les séquences ont été téléchargées de EnsemblProtists (EMBL, EBI) en utilisant la souche *Phaeodactylum tricornutum* (ASM15095v2).

Table 5. Numéros d'accès sur EnsemblProtists des séquences ciblées chez *Phaeodactylum tricornutum*. **pb** : paire de bases

Enzyme ciblée	Localisation enzyme	Numéro d'accès	Taille du gène
PEAMT (Phosphoéthanolamine N-méthyltransférase)	Réticulum endoplasmique	Phatr3_J39710	918 pb
BTA-like (DGTS synthase)	Réticulum endoplasmique	Phatr3_J42872	2427 pb
PGPS (CDP-diacylglycérol-glycérol-3-phosphate 3-phosphatidyltransférase)	Chloroplaste	Phatr3_J8663	897 pb
SQD2 (UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransférase)	Chloroplaste	Phatr3_EG02454	2149 pb
		Phatr3_J50356	1868 pb

3.2 Transformation de *Microchloropsis gaditana* par recombinaison homologue

3.2.1 Les gènes ciblés

La recombinaison homologue est également une technique d'édition de génome, facilement utilisable chez les organismes haploïdes (une seule copie du gène). Le principe réside sur un appariement et un échange de matériel génétique entre deux molécules d'ADN. Dans cette étude, le but est donc de remplacer la séquence d'ADN du gène ciblé par une autre séquence d'ADN, dans ce cas précis, une séquence de résistance à un antibiotique.

7 gènes ont été ciblés individuellement par la recombinaison homologue, dont les numéros d'accès sont présentés dans la *Table 6*. Les séquences ont été téléchargées de EnsemblProtists (EMBL, EBI) en utilisant la souche *Nannochloropsis gaditana* B-31.

Table 6. Numéros d'accès sur EnsemblProtists des séquences ciblées chez *Microchloropsis gaditana*. **pb** : paire de bases

Enzyme ciblée	Localisation enzyme	Numéro d'accès	Taille du gène
PEAMT (Phosphoéthanolamine N-méthyltransférase)	Réticulum endoplasmique	Naga_100219g4	1914 pb
		Naga_100005g102	1146 pb
BTA-like (DGTS synthase)	Réticulum endoplasmique	Naga_100016g36	2429 pb
PGPS (CDP-diacylglycérol-glycérol-3-phosphate 3-phosphatidyltransférase)	Chloroplaste	Naga_100081g13	1445 pb
SQD2 (UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransférase)	Chloroplaste	Naga_100208g9	1677 pb
		Naga_100008g19	2034 pb
		Naga_100010g28	1991 pb

3.2.2 Le gène de résistance à la zéocine

Pour sélectionner les microalgues transformées par recombinaison homologue, le gène *Sh ble*, permettant une résistance à l'antibiotique zéocine a été choisi. La séquence à insérer dans le génome de *Microchloropsis gaditana* par recombinaison homologue comporte un promoteur, le gène *Sh ble* et un terminateur (*Figure 20*). Le promoteur choisi est le promoteur UEP (Ubiquitin Extension Protein), connu pour avoir des bons rendements de transformations chez *Microchloropsis gaditana* (Radakovits et al., 2012), et le terminateur *fcpA*, utilisé classiquement pour les transformations chez *Phaeodactylum tricornutum* (Hamilton et al., 2014). La séquence ADN du gène de résistance à la zéocine a été optimisée pour *Microchloropsis gaditana* en utilisant le site OPTIMIZER (Puigbo et al., 2007), et la table des codons d'usage de *Microchloropsis gaditana* référencés par Robert E. Jinkerson (Jinkerson, n.d.).

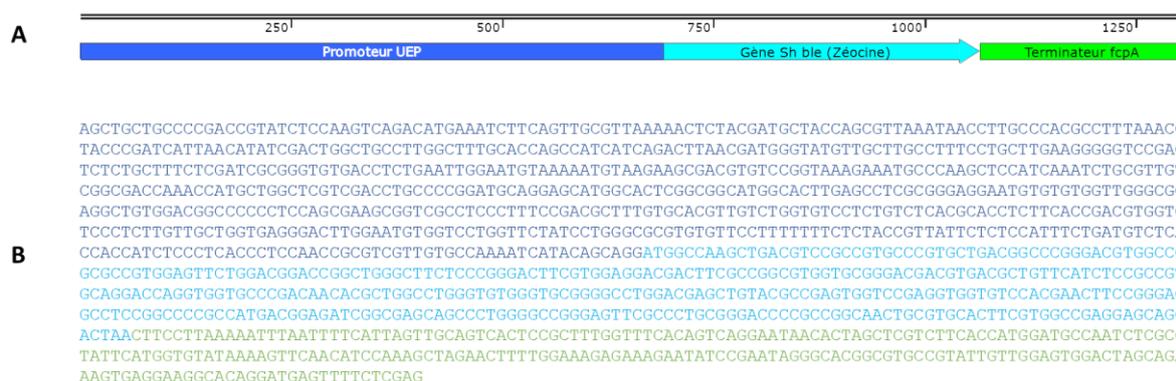


Figure 20. Séquence ADN utilisée pour la transformation de *Microchloropsis gaditana* par recombinaison homologue. La séquence comporte le promoteur UEP (**bleu foncé**), le gène de résistance à la zéocine, *Sh ble* (**bleu clair**) et le terminateur *fcpA* (**vert**). **A.** Séquence schématisée. **B.** Séquence ADN dans le sens 5'-3'.

3.2.4 Protocole de transformation par recombinaison homologue

Les cellules de *Microchloropsis gaditana* sont cultivées en milieu liquide F/2 non carencé (Table 2). La densité cellulaire de la culture est déterminée par comptage automatique au LUNA FL (Logos). Pour chaque transformation, $2 \cdot 10^8$ cellules sont nécessaires pour s'affranchir des pertes cellulaires lors des étapes de lavage et de centrifugation. Le volume nécessaire est transféré dans un tube à centrifuger 50-mL. Les cellules sont centrifugées à 3 500 x g pendant 13 min à 4°C, et le surnageant est jeté. Les cellules sont ensuite lavées avec une solution de sorbitol à 375 mM à 4°C par agitation manuelle. Les étapes de lavage servent à éliminer les sels du milieu de culture et sont critiques pour éviter la formation d'arc électrique lors de l'électroporation. Une fois le culot cellulaire en suspension, les cellules sont centrifugées à 3 500 x g pendant 2 min à 4°C. Le surnageant est jeté, et une deuxième étape de lavage est réalisée. Après centrifugation, le culot de cellules est resuspendu avec 100 µL de sorbitol par aspiration et refoulement à la pipette. La totalité du volume est transféré dans un tube de 0,2-mL stérile préalablement stocké sur la glace. 500 à 1 000 ng de cassette d'ADN sont ajoutés (dans un volume maximal ne dépassant les 1/3 du volume cellulaire), et le tube est stocké sur la glace pendant 10 à 15 min.

La solution est ensuite transférée stérilement dans une cuvette d'électroporation avec un espace de 0,2 cm entre les deux plaques métalliques conductrices (BioRad). La résistance de la solution est mesurée par l'électroporateur NEPA21 Super (Nepa Gene). La résistance doit être comprise entre 500 et 1 000 Ω. Si elle est très élevée (>1 300 Ω), 0,5 à 1 µL de milieu F/2 est ajouté. Sinon il est possible de refroidir ou chauffer légèrement la cuvette pour respectivement augmenter ou diminuer la résistance de la solution. L'électroporation est effectuée à 2 400 V par l'électroporateur *Escherichia coli* Pulser (BioRad). Après le choc électrique, les cellules sont rapidement reprises dans du milieu F/2 et transférées dans un erlenmeyer 50-mL contenant 5 mL de milieu F/2 non sélectif. L'erlenmeyer est mis dans l'incubateur avec les mêmes conditions de culture que la souche sauvage (section 1.3.2) pendant 2 jours.

Après ces 2 jours de récupération, les cellules sont transférées dans un tube à centrifuger 50-mL et centrifugées à 3 500 x g pendant 5 min. Le surnageant est jeté, et le culot est resuspendu avec 200 µL de F/2 par aspiration et refoulement à la pipette. La totalité des cellules est déposée en grosse goutte au centre d'un milieu agar sélectif zéocine à 7 µg.mL⁻¹ (section 1.3.2). La goutte est étalée en faisant tourner 2 fois à 360° un étaleur stérile en forme de L (Dutscher). Le tapis cellulaire formé est séché sous la hotte stérile, avant de fermer la boîte avec du parafilm. La boîte est stockée dans l'incubateur en lumière continue (section 1.3.2). Après environ 6 semaines de croissance, des colonies résistantes peuvent apparaître sur la boîte.

3.2.5 Sélection des transformants par PCR sur colonies

Les colonies résistantes à la zéocine après transformation sont transférées en spot dans 10 µL de F/2 sur un nouveau milieu agar zéocine. Après 10 jours de croissance, les spots sont de nouveau transférés sur un milieu agar zéocine pour limiter les colonies faux-positives. Après 10 jours de croissance, les colonies peuvent être vérifiées par PCR (section 2.2.1).

Plusieurs couples de primers ont été choisies pour le contrôle de la recombinaison homologue chez les transformants obtenus (*Figure 22, Table 7*) permettant de vérifier :

- L'insertion de la cassette côté -1000 pb
 - Primer dans le gène *Sh ble* (PCR 1, attendu positif)
 - Primer dans le gène WT (PCR 2, attendu négatif)
- L'insertion de la cassette côté +1000 pb
 - Primer dans le gène *Sh ble* (PCR 3, attendu positif)
 - Primer dans le gène WT (PCR 4, attendu négatif)



Figure 22. Schéma simplifié de la position des primers pour la vérification de la recombinaison homologue chez *Microchloropsis gaditana*. Si la recombinaison homologue est réussie, les PCR 1 et 4 sont attendues positives et les PCR 2 et 4 négatives.

Les différentes PCR contrôles ont été réalisées :

- Contrôle négatif : pureté de l'eau
- Contrôle négatif : absence du gène *Sh ble* chez le WT
- Contrôle positif : présence du gène WT chez le WT

Contrôle positif : présence du gène *Sh ble* chez les transformants

Table 7. Couples de primer utilisés pour la vérification des transformants de *Microchloropsis gaditana* par PCR.
WT : Wild Type.

Enzyme	Cellules	Fragment	Sens 5' → 3'	Primer	Taille fragment (pb)	
PEAMIT_4	WT	-1000 et gène	Forward	TTCTCGCCCTGGGTATGGTC	1424	
			Reverse	TGATGACGGATATGACGGCG		
		Gène et +1000	Forward	TGTTCTCTGCCAGTATCCCG	1435	
			Reverse	GGCCCATCTAGAAAGCTG		
		Mutant	-1000 et gène Zéocine	Forward	TTCTGGCCCTGGGTATGGTC	1360
				Reverse	TTTACCGGACACGTCTCTTC	
	Gène Zéocine		Forward	TGTTCTCACGACCTCTTCAC	611	
			Reverse	CAAAGCGGAGTGACTGCAAC		
	Gène Zéocine et +1000	Forward	GTTCAGTCACTCCGCTTTG	1392		
		Reverse	GGGCCATCTAGAAAGCTG			
	PEAMIT_102	WT	-1000 et gène	Forward	GCAGGGCCATAAAGGAGCA	1480
				Reverse	CTTGAGTTTCATTTGCCACGC	
Gène et +1000			Forward	TGACGGAAATCAAAGCCGCA	1320	
			Reverse	TGGTGGTGTATCAAGGAG		
Mutant			-1000 et gène Zéocine	Forward	GCCAGGGCCATAAAGGAGCA	1454
				Reverse	TTTACCGGACACGTCTCTTC	
		Gène Zéocine	Forward	TGTTCTCACGACCTCTTCAC	611	
			Reverse	CAAAGCGGAGTGACTGCAAC		
Gène Zéocine et +1000		Forward	GTTCAGTCACTCCGCTTTG	1325		
		Reverse	TGGTGGTGTATCAAGGAG			
DGTS synthase_36		WT	-1000 et gène	Forward	CAGAACTTAGTGAGGGGCA	1578
				Reverse	CTCGTTTCTCTCAACCACAA	
	Gène et +1000		Forward	TGGCGTTCGTAATGAGCTGT	1463	
			Reverse	GTTCAGGATTAGCGCCATGC		
	Mutant		-1000 et gène Zéocine	Forward	CAGAACTTAGTGAGGGGCA	1558
				Reverse	TTTACCGGACACGTCTCTTC	
		Gène Zéocine	Forward	TGTTCTCACGACCTCTTCAC	611	
			Reverse	CAAAGCGGAGTGACTGCAAC		
	Gène Zéocine et +1000	Forward	GTTCAGTCACTCCGCTTTG	1522		
		Reverse	GTTCAGGATTAGCGCCATGC			
	PGPS_13	WT	-1000 et gène	Forward	TACAATGAAGGGGCCAAA	1432
				Reverse	ACATACCTGGAACCTGCCTGC	
Gène et +1000			Forward	TAGCCGAGTATGAACCTG	1833	
			Reverse	ACGATTATCACCGGTGCTT		
Mutant			-1000 et gène Zéocine	Forward	TACAATGAAGGGGCCAAA	1500
				Reverse	TTTACCGGACACGTCTCTTC	
		Gène Zéocine	Forward	TGTTCTCACGACCTCTTCAC	611	
			Reverse	CAAAGCGGAGTGACTGCAAC		
Gène Zéocine et +1000		Forward	GACGTGACCGCTTTCATCTC	1742		
		Reverse	ACGATTATCACCGGTGCTT			
SOD2_9		WT	-1000 et gène	Forward	CGTCATGGGTTGAGTTCTGG	1464
				Reverse	CAGTGGGTCGAGCACCATAA	
	Gène et +1000		Forward	GGAAAGCGAGTGTAAACAGC	1461	
			Reverse	GACAACTTTGACGCTCAGC		
	Mutant		-1000 et gène Zéocine	Forward	CGTCATGGGTTGAGTTCTGG	1362
				Reverse	TTTACCGGACACGTCTCTTC	
		Gène Zéocine	Forward	TGTTCTCACGACCTCTTCAC	611	
			Reverse	CAAAGCGGAGTGACTGCAAC		
	Gène Zéocine et +1000	Forward	GTTCAGTCACTCCGCTTTG	1325		
		Reverse	GACAACTTTGACGCTCAGC			
	SOD2_19	WT	-1000 et gène	Forward	GCGGATTTAAGTTGGCTCT	1547
				Reverse	CAAAGTACCCGCCCTTCTT	
Gène et +1000			Forward	TGGGTATCTGTGCTGGTGG	1263	
			Reverse	CCACTCGGATTTGCCGTTTGG		
Mutant			-1000 et gène Zéocine	Forward	GCGGATTTAAGTTGGCTCT	1436
				Reverse	TTTACCGGACACGTCTCTTC	
		Gène Zéocine	Forward	TGTTCTCACGACCTCTTCAC	611	
			Reverse	CAAAGCGGAGTGACTGCAAC		
Gène Zéocine et +1000		Forward	GTTCAGTCACTCCGCTTTG	1297		
		Reverse	CCACTCGGATTTGCCGTTTGG			
SOD2_28		WT	-1000 et gène	Forward	CTCCTCCGACACTGCATCA	1403
				Reverse	CTTCTAGTGGCCGTGGGAG	
	Gène et +1000		Forward	AGGTACTTTGCATTTGGCGA	1481	
			Reverse	CAGACCAGAACTACGTGCTCA		
	Mutant		-1000 et gène Zéocine	Forward	CTCCTCCGACACTGCATCA	1400
				Reverse	TTTACCGGACACGTCTCTTC	
		Gène Zéocine	Forward	TGTTCTCACGACCTCTTCAC	611	
			Reverse	CAAAGCGGAGTGACTGCAAC		
	Gène Zéocine et +1000	Forward	GTTCAGTCACTCCGCTTTG	1373		
		Reverse	CAGACCAGAACTACGTGCTCA			

4 Méthodes d'analyses biochimiques des lipides

4.1 Les lipides synthétiques

Trois lipides synthétiques ont été utilisés dans ce projet et commandés chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Les lipides sont stockés à -20°C.

- 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) avec deux acides gras 16:0. 10 mg.mL⁻¹ en solution dans du chloroforme. *Référence 850355C*.
- Le 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homoserine (DP-DGTS) avec deux acides gras 16:0. 5 mg de poudre. *Référence 857464P*.
- Le 1,2-didocosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PC 22:6) avec deux acides gras 22:6. 10 mg.mL⁻¹ en solution dans du chloroforme. *Référence 850400C*.

4.2 Méthode d'extraction de lipides

Les lipides des organismes d'études sont extraits selon la méthode de Folch (Folch et al., 1957), détaillée ci-dessous.

4.2.1 Extraction des lipides d'*Arabidopsis thaliana*

Les feuilles issues de culture de plantules d'*Arabidopsis thaliana* (section 1.1.2) sont lyophilisées pendant une nuit. Elles sont ensuite réduites en poudre par broyage dans de l'azote liquide, puis transférées dans un erlenmeyer avec 120 mL d'éthanol absolue bouillant pendant 5 min, pour inactiver les lipases. Les lipides sont extraits en ajoutant un mélange MeOH/CHCl₃ 40/160 (v/v). L'erlenmeyer est saturé avec de l'argon, puis fermé et laissé sous agitation pendant 1 h à température ambiante. La solution est filtrée sur laine de quartz lavée à l'éthanol dans une ampoule à décanter. Les débris cellulaires sont rincés avec 60 mL de CHCl₃/MeOH 1/1 (v/v), puis filtrés dans l'ampoule. A la fin de la filtration, 68 mL NaCl 1 % sont ajoutés directement dans l'ampoule à décanter et les solvants sont mélangés sous argon. L'ampoule est fermée et laissée une nuit à température ambiante pour la formation des deux phases. La phase organique, en bas de l'ampoule, contenant les lipides, est récupérée puis séchée en bain-marie (maximum 40°C) sous argon pendant environ 3h30. Les lipides sont resuspendus avec du CHCl₃ pur, puis transférés dans un tube Pyrex™. Après évaporation du solvant, les lipides peuvent être stockés à -20°C avant analyses.

4.2.2 Extraction des lipides de *Phaeodactylum tricornutum* et *Microchloropsis gaditana*

A partir d'une culture liquide de 2 L pour *Phaeodactylum tricornutum* et 300 mL pour *Microchloropsis gaditana*, en milieu riche non carencé, la concentration cellulaire est mesurée pour prélever $64,6 \cdot 10^9$ et $169,5 \cdot 10^9$ cellules respectivement pour chaque microalgue. Les cultures cellulaires sont placées dans un tube à centrifuger 50-mL. Le surnageant est éliminé par centrifugation à $3\,500 \times g$ pendant 9 min. Le culot est resuspendu dans 1 mL de milieu de culture, puis transféré dans un tube 1,5-mL dont le bouchon est préalablement percé pour l'étape de lyophilisation. Les cellules sont de nouveau centrifugées à 1 000 rpm pendant 4 min. Le surnageant est retiré à la pipette. La masse du culot peut être noté en tarant initialement le tube. Les cellules sont plongées rapidement dans l'azote liquide et peuvent être stockées à -80°C jusqu'à moment de l'extraction.

Les cellules sont lyophilisées (Alpha 2-4 LSCbasic, Christ) pendant une nuit. Les tubes sont récupérés et placés dans un bac d'azote liquide pour éviter toute dégradation du matériel. Le culot de cellules est transvasé dans un tube Corex 30-mL préalablement placé dans le bac d'azote liquide, puis est réduit en poudre par broyage manuel à l'aide d'un pilon. Le tube Corex est sorti de l'azote liquide et est transféré sous hotte pour ajouter 4 mL d'EtOH bouillant pour neutraliser les lipases. Le tube est fermé et incubé 5 min dans un bain-marie à 85°C . Le pilon est rincé dans le tube Corex avec 2 fois 1 mL de MeOH. Le tube est ensuite sorti du bain-marie pour y ajouter 8 mL de CHCl_3 . La solution est mélangée sous argon pendant 1 min, puis le tube est fermé et laissé incubé 1 h à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré sur laine de verre dans un nouveau tube. La laine de verre est rincée en ajoutant 3 mL de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3/1 (v/v). La biphasé est ensuite formée par l'ajout de 5 mL de NaCl 1 %. Le tube Corex est fermé et mélangé 1 min sous argon. Les deux phases sont séparées par centrifugation à $2\,500 \text{ rpm}$ pendant 10 min. La phase organique inférieure contenant les lipides est récupérée dans un nouveau tube Corex. Les solvants sont évaporés sous argon et en bain-marie à 40°C , pendant environ 1h30. Les lipides sont resuspendus dans 3 fois 500 μL de CHCl_3 dans un tube à hémolyse en lavant bien les parois du tube Corex. Le solvant est évaporé sous argon et les lipides peuvent être stockés à -20°C avant d'être analysés.

4.3 Séparation des lipides par chromatographie

Les classes des lipides extraits sont ensuite séparées en 2-dimensions par chromatographie sur plaque de TLC (*Thin Layer Chromatography*) silica gel 60 F₂₅₄ sur verre 20x20 (Merck). 1 mg de lipides sont déposés à l'aide d'un capillaire dans l'angle à gauche de la plaque à 1,5 cm du bord inférieur et 1,5 cm du bord gauche. Avant chaque migration, la cuve est saturée pendant 30 min avec le mélange

de solvants de migration. La première migration est faite avec le mélange de solvants $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65/25/4 (v/v/v), pendant environ 1h30. La plaque est ensuite séchée sous sorbonne 20 min, puis toute la nuit sous cloche argon. La plaque est ensuite tournée à 90° et la deuxième migration se fait avec le mélange de solvant $\text{CHCl}_3/\text{Acétone}/\text{MeOH}/\text{Acide Acétique}/\text{H}_2\text{O}$ 50/20/10/10/5 (v/v/v/v/v), pendant environ 1h30. La plaque est de nouveau séchée 20 min sous sorbonne, puis 1 h sous cloche argon. La révélation des tâches de lipides est réalisée par pulvérisation sous sorbonne de l'Anilino-Naphtalène-Sulfonate (ANS) à 0,2 % dans du MeOH. Après 10 min de séchage sous sorbonne, les lipides sont visualisés en Ultra-Violet (U.V.). Les tâches sont repérées, identifiées et délimitées au crayon. Une photographie de la plaque peut être faite au visualizer de TLC (Camag). La silice de chaque tâche est ensuite grattée et récupérée séparément dans des tubes à essai à vis Pyrex™ 40-mL. Les tubes sont fermés sous argon et stockés à -20°C .

4.4 Extraction des lipides de la silice

Pour chaque classe de lipides, la silice est transvasée dans un tube Corex 30-mL. Les lipides sont solubilisés par ajout progressif de 13,5 mL de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1/2 (v/v) en 3 fois 4 mL puis 1,5 mL restant. Entre chaque ajout, la solution est mélangée par vortex. 4,5 mL de CHCl_3 sont ajoutés, avant de mélanger à nouveau. Le biphasé est formé par ajout de 8 mL d' H_2O , puis mélangé sous argon pendant 1 min. Les deux phases sont séparées 10 min à température ambiante, puis par centrifugation pendant 10 min à 3 000 rpm. La phase organique inférieure contenant les lipides est récupérée dans un nouveau tube Corex 30-mL. Le biphasé est de nouveau formé dans le premier tube, comme l'étape précédente, en ajoutant 12 mL de CHCl_3 . La phase inférieure est poolée avec la phase organique précédente dans le deuxième tube. Le chloroforme est évaporé sous argon et en bain-marie à 40°C . Les lipides sont récupérés avec 3 fois 1 mL de CHCl_3 dans un tube à hémolyse, en lavant bien les parois du tube Corex. Après évaporation, 500 μL de CHCl_3 sont ajoutés puis évaporés de nouveau pour que tous les lipides soient bien au fond du tube. Les tubes sont stockés à -20°C .

4.5 Analyse de la composition en acides gras des classes de lipides

4.5.1 La méthanolyse des lipides

La méthanolyse est une technique de quantification des acides gras, et par extension des lipides, par la formation d'esters méthyliques d'acides gras (FAMES). La méthanolyse n'est réalisée que sur une partie des lipides extraits précédemment.

Dans le tube à hémolyse contenant les lipides à doser, 2 mL de CHCl_3 sont rajoutés et mélangés au vortex pour resuspendre la totalité des lipides. Seulement 10 μL de cette préparation sont prélevés et mis dans un tube Pyrex™ à vis de 15-mL. Le standard interne C15, nécessaire à la quantification des acides gras, est rajouté à hauteur de 5 μg . 3 mL du milieu de méthanolyse (MeOH/Acide sulfurique 400/20 (v/v)) sont rajoutés, avant de fermer le tube hermétiquement pour éviter toute évaporation des solvants. Les tubes sont placés à 100°C pendant 1 h. La réaction est stoppée et le biphasé est formé par l'ajout de 3 mL d' H_2O et 3 mL d'hexane. Après mélange au vortex, les tubes sont laissés 20 min à température ambiante. La phase hexane supérieure contenant les acides gras méthylés est récupérée dans un tube à hémolyse. Le milieu de méthanolyse est extrait une seconde fois en rajoutant 3 mL d'hexane dans le tube Pyrex™ et en mélangeant au vortex. Après 20 min d'attente, le biphasé est de nouveau formé et la phase supérieure est de nouveau prélevée et poolée avec la précédente dans le tube à hémolyse. Le tout est évaporé sous argon avant d'être repris dans 200 μL d'hexane pour laver les parois du tube et récupérer tous les acides gras méthylés au fond du tube. Le solvant est évaporé et les acides gras peuvent être stockés à -20°C.

4.5.2 Quantification des acides gras méthylés par GC-FID.

Les acides gras méthylés issus de la méthanolyse, présents dans le tube à hémolyse, sont repris dans 50 μL d'hexane et transférés dans un vial de chromatographie contenant un insert. Un vial contenant seulement de l'hexane est utilisé comme contrôle négatif.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) (Clarus 580, Perkin Elmer) est utilisée pour quantifier les acides gras présents en solution. Le gaz inerte porteur, l'azote, passe dans la colonne à un débit de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La colonne capillaire polaire en silice (30 m, diamètre 0,32 mm) avec un revêtement intérieur à 70 % cyanopropyl polysilphénylène siloxane (BPX70) (SGE™), constitue la phase stationnaire, et est placée dans un four à 180°C. L'échantillon est injecté dans un injecteur split (240°C) du chromatogramme, passe dans la colonne, où les acides gras méthylés sont plus ou moins accrochés en fonction de leur affinité avec le BPX70, permettant de les séparer dans le temps en fonction de leur polarité dépendante de leur longueur de chaîne carbonée et de leur nombre d'insaturations. Les acides gras méthylés sont décrochés de la colonne en augmentant la température du four de 3°C $\cdot\text{min}^{-1}$, jusqu'à atteindre 230°C. Lorsqu'une molécule organique portée par le gaz vecteur atteint la flamme située au bout de la colonne, elle est oxydée et génère des ions chargés électriquement. Ces ions sont détectables par un électromètre sous forme de tension. Le courant produit est proportionnel à la quantité d'échantillon brûlée. Par comparaison aux temps de rétention connus, il est possible de déterminer la correspondance du pic du

chromatogramme obtenu avec l'acide gras détecté. Ensuite, comme la quantité de standard interne C15 est connue, par proportionnalité, la quantité de chaque acide gras composant l'échantillon est connue, et permet ainsi d'accéder à la quantité de la classe lipidique en sommant les acides gras.

4.6 Analyse de la pureté et de la composition des lipides par MS type trappe

Pour vérifier la pureté des lipides extraits d'une part, et la position *sn-1* et *sn-2* des acides gras sur le squelette glycérol, les lipides sont analysés en spectrométrie de masse type trappe à ions (MS/MS) (Amazon XL, Bruker). Les lipides sont resuspendus dans une solution de 10 mM d'acétate d'ammonium dans du méthanol. Ils sont ensuite introduits par infusion dans la source électrospray du spectromètre de masse. Les lipides sont ionisés dans la source et guidés par potentiel électrique, et séparés en fonction de leur rapport m/z . La trappe à ions permet de piéger un ion de m/z donné, pour ensuite le fragmenter de nouveau. Le rapport m/z des têtes polaires et celle de acides gras étant connus, ainsi que le pattern de fragmentation (Abida et al., 2015) la structure du lipide peut être reconstituée.

5 Méthodes d'analyses physiques des lipides

5.1 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

L'analyse des lipides en diffraction de neutrons est réalisée sur des lipides en phase fluide. Les lipides naturels extraits des organismes étant en phase fluide à la température de culture des échantillons, la température est choisie à 25°C. Pour déterminer la température de travail à utiliser pour les lipides synthétiques, la calorimétrie différentielle à balayage est utilisée.

5.1.1 Formation de vésicules mono-dispersées

Les lipides synthétiques sont mis en suspension dans de l'eau milli-Q à une concentration de 0,1 et 0,2 % respectivement pour DPPC et DP-DGTS. Les lipides sont soniqués pendant 5 min. Toutes les pièces de l'extrudeur (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) sont soniquées à 60°C pendant 20 min, puis assemblées comme sur le schéma ci-dessous (*Figure 23*). Les membranes en polycarbonate (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) ont des pores de 100 nm de diamètre sont humidifiées à l'eau milli-Q avant d'être installées. Le dispositif est chauffé à 50°C. L'échantillon est passée 11 fois à travers

les membranes à l'aide de deux seringues Hamilton™ placées de part et d'autre du dispositif pour former des vésicules unilamellaires de 100 nm de diamètre.

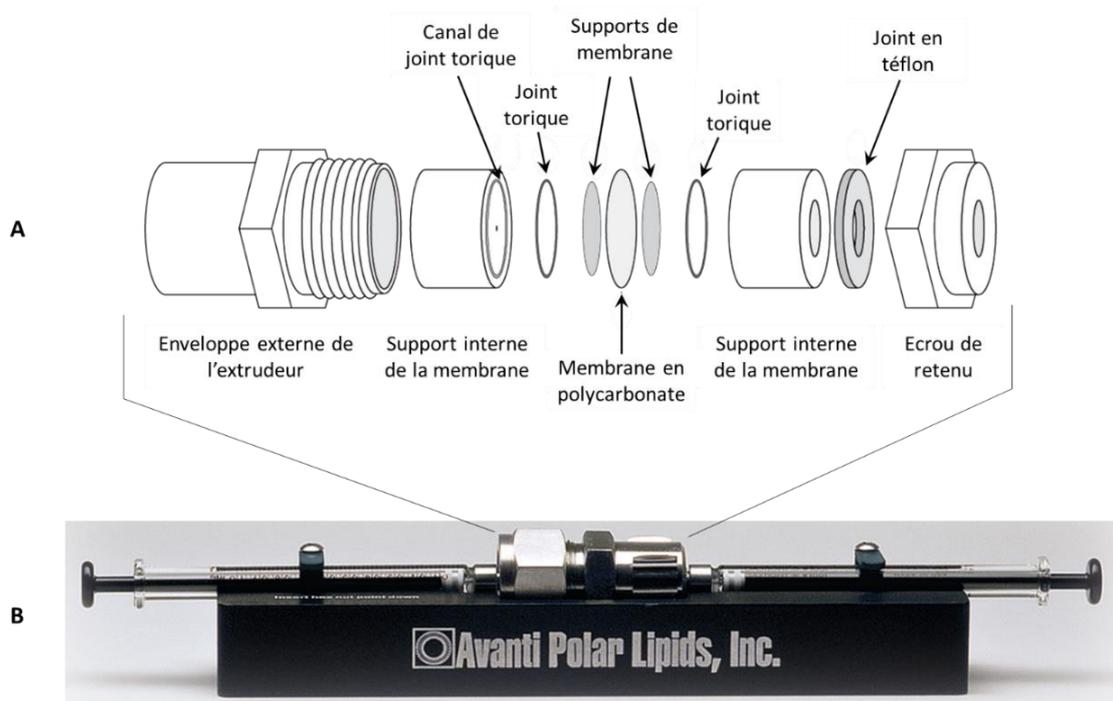


Figure 23. Schéma du montage de l'extrudeur (Avanti Polar Lipids) pour la formation de vésicules unilamellaires de 100 nm de diamètre. Les membranes en polycarbonate sont humidifiées avant d'être placées dans le dispositif. La solution de lipides synthétiques soniquée, et extrudée 11 fois à travers les membranes. **A.** Assemblage de la membrane dans le dispositif d'extrusion. **B.** Montage complet de l'extrudeur avec une seringue Hamilton™ de part et d'autre de l'assemblage, maintenues sur le support. Le dispositif complet est chauffé à 50°C sur une plaque chauffante.

5.1.2 Cycles de DSC

0,5 mL de la solution préparée précédemment, sont placés dans des creusets en aluminium. Un creuset de référence contient le même poids en eau que le creuset contenant la suspension de vésicules lipidiques. Les vésicules subissent quatre cycles identiques, détaillés ci-dessous (*Table 8*). Le premier cycle permet de mettre le système en équilibre, et les trois suivants sont des triplicats de l'expérience. Le graphique du flux de chaleur obtenu en fonction de la température, permet de déterminer la température de transition de phase des lipides.

Table 8. Détails des cycles de DSC. 4 cycles identiques sont réalisés, le premier cycle permet d'équilibrer le système, avant de réaliser 3 cycles identiques. Les cycles sont précédés d'une phase de refroidissement et terminés par une phase de chauffage pour remettre le système à température ambiante. **K** : température en Kelvin.

		Température initiale	Température finale	Taux et temps
Phase initiale	Refroidissement	20°C	-4°C	2 K.min ⁻¹
4 cycles	Plateau	-4°C	-4°C	1200 sec
	Chauffage	-4°C	55°C	0,5 K.min ⁻¹
	Plateau	55°C	55°C	1200 sec
	Refroidissement	55°C	-4°C	0,5 K.min ⁻¹
Phase finale	Chauffage	-4°C	20°C	2 K.min ⁻¹

5.2 La diffraction de neutrons

Les données de diffraction de neutrons et de SANS (Small-Angle Neutron Scattering) ont été collectées à l'instrument D16 (*Figure 24*), un diffractomètre à neutrons froids, de l'Institut Laue-Langevin (ILL, Grenoble, France) (Cristiglio et al., 2015).

5.2.1 Préparation des échantillons

Des wafers en silicium de 5 cm de diamètre et 275 µm d'épaisseur (Si-Mat, Kaufering, Allemagne), sont découpés en plaques rectangulaires de 75 mm de hauteur et 20 mm de large. 500 µg à 1 mg de lipides sont mis en suspension dans 500 µL de CHCl₃/MeOH 1/2 (v/v), puis déposés sur les wafers en silicium maintenus horizontaux. Le solvant est laissé évaporé à température ambiante, puis les wafers sont séchés sous vide pendant 30 min pour éliminer toutes traces de solvant. Les échantillons sont ensuite placés dans un environnement saturé en D₂O (deutérium), représentant donc une hydratation maximale des lipides, pendant toute une nuit, dans une étuve à 50°C pour les lipides synthétiques et à température ambiante pour les lipides d'extraits naturels.

L'expérience de SANS a été réalisée uniquement pour les lipides DPPC et DP-DGTS. Les lipides sont préparés en solution aqueuse dans du D₂O pur à une concentration de 10 et 3 % (masse/volume) respectivement. Chaque solution est mélangée par vortex avant d'être transférée dans une cellule de quartz de 1 mm (Hellma, Allemagne) pour l'acquisition des données.

5.2.2 Solvants de contraste

Deux contrastes de solvants ont été utilisés avec des ratio différents de H₂O/D₂O : 0/100 et 92/8 (v/v), permettant de distinguer l'eau des membranes lipidiques avec des densités de longueur de

diffusion des neutrons (NSLD : *Neutron Scattering Length Density*) différents. En utilisant des lipides protonés, le contraste 100 % D₂O fournit des intensités élevées et un bruit de fond incohérent faible, alors que le contraste 8 % D₂O met en évidence les têtes polaires des lipides à une NSLD de l'eau nulle, c'est-à-dire égale à celle du vide ou de l'air. Ce second contraste donne les profils NSLD des membranes permettant de déterminer directement les épaisseurs de bicouches (Salvador-Castell et al., 2020), car seul le lipide contribue alors au profil de densité. La densité des têtes polaires domine celle des chaînes aliphatiques riches en protons.

5.2.3 Contrôle de l'humidité relative dans la chambre

5.2.3.1 Mise en place de l'échantillon dans la chambre d'humidité

Après saturation pendant une nuit dans un environnement deutéré, l'échantillon est transféré et fixé verticalement sur un goniomètre manuel à 4 axes (Huber et Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB), Allemagne) à l'intérieur de la chambre d'humidité de haute précision BerILL, développée à l'ILL (Gonthier et al., 2019). L'échantillon est ensuite pré-aligné à l'aide d'un dispositif laser pour que le wafer soit parallèle au faisceau de neutrons incident. L'eau est placée dans un réservoir situé en bas de la chambre sous l'échantillon. Autour de l'échantillon, de nombreux capteurs permettent de mesurer en temps réel la température, la pression et l'humidité relative à l'intérieur de la chambre (*Figure 24.B*). La chambre est ensuite fermée hermétiquement et l'enceinte double-paroi est mise sous vide afin d'assurer une parfaite isolation avec l'environnement extérieur. La chambre est ensuite placée dans l'axe du faisceau sur la table de rotation échantillon (axe Ω) (*Figure 24.C*), ou équilibrée à l'extérieur du faisceau. Trois chambres identiques sont à disposition, permettant d'équilibrer deux échantillons le temps de mesure d'un troisième.

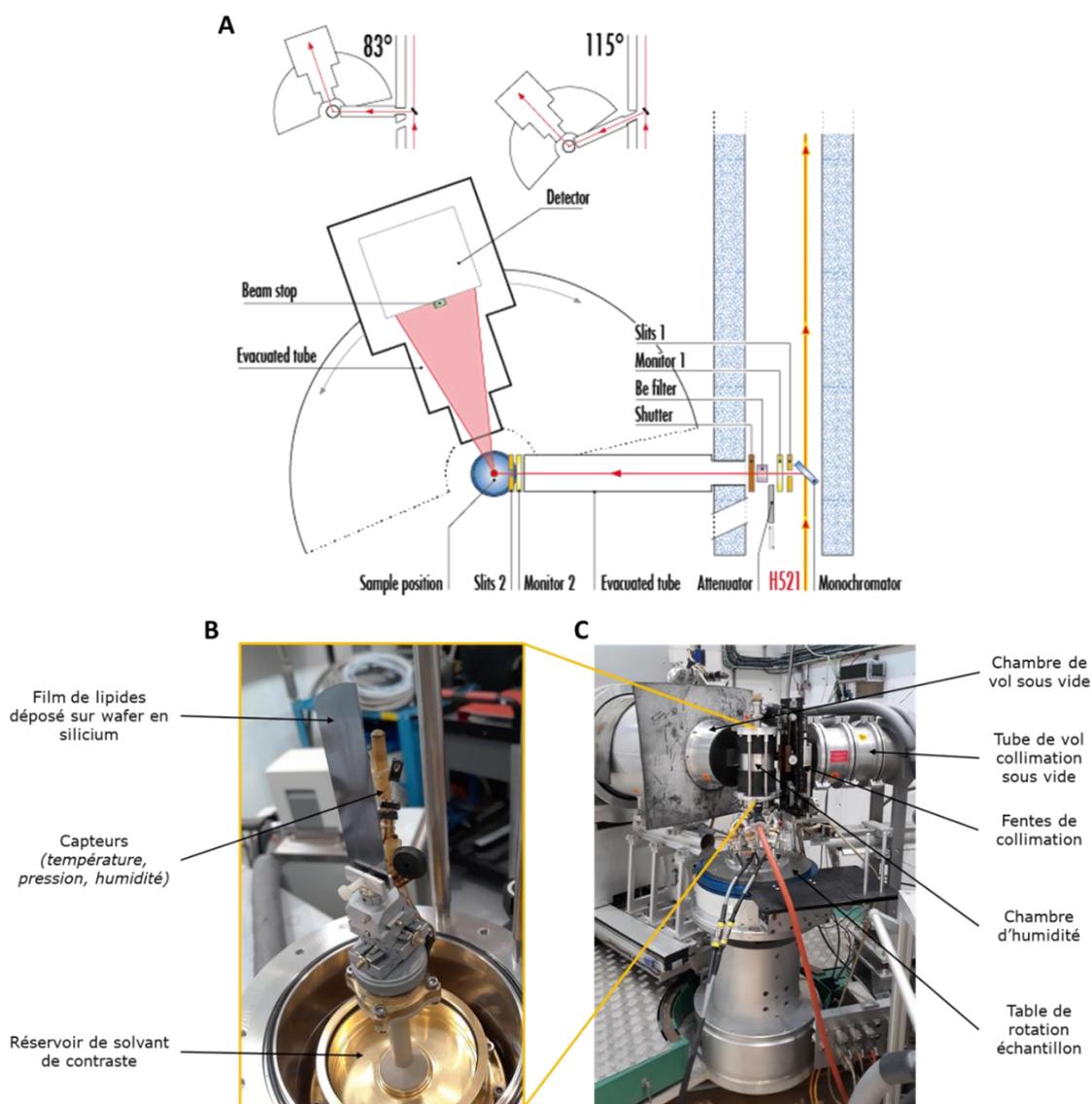


Figure 24. (A) Schéma en vue du dessus de la géométrie de l'instrument D16 montrant le trajet des neutrons (flèches rouges). (B) Montage de l'échantillon dans la chambre d'humidité, contenant des capteurs et un réservoir pour le solvant de contraste. (C) Installation de la chambre d'humidité dans l'axe du faisceau sur la table rotative de l'instrument.

5.2.3.2 L'humidité relative (RH) dans la chambre

La température des échantillons est maintenue constante au cours de l'acquisition des données à l'aide d'un circuit d'eau à 25 ou 50°C, respectivement pour les lipides naturels ou synthétiques. L'humidité à l'intérieur de la chambre est modifiée par changement de la température du réservoir d'eau, par un deuxième circuit d'eau indépendant du premier. Dans un système clos et à l'équilibre où l'échantillon et le réservoir seraient à la même température, l'humidité relative dans la chambre serait de 100 %. La différence de température entre l'échantillon et le réservoir induit une baisse de l'humidité relative d'autant plus grande que la température du réservoir est basse. Dans le

protocole de mesure, l'humidité relative est augmentée étape par étape de 30 à 100 % et suivie *in situ* sans ouvrir la chambre entre chaque étape. Avant chaque acquisition à une humidité donnée, l'échantillon est équilibré à l'humidité souhaitée, 1 h pour les faibles humidités et jusqu'à 3 h pour les hautes humidités. L'équilibre à 100 % d'humidité est réalisé hors faisceau pendant plus d'une nuit au minimum.

L'erreur δRH associée à l'humidité relative dans la chambre a été calculée à partir des erreurs de mesure par les capteurs de températures de l'échantillon et du réservoir de solvant de contraste. Pour les deux températures mesurées, une estimation de l'erreur est faite avec $\delta T_{sample} = \pm 0,05^\circ C$ et $\delta T_{res} = \pm 0,05^\circ C$. Ainsi, pour chaque couple de températures d'échantillon et de réservoir correspond une humidité RH. L'erreur δRH correspond à l'écart-type des quatre RH calculées, d'après :

$$\delta RH = \sigma_{RH} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (RH_i - \overline{RH})^2}, \text{ ici } N = 4 \quad (1)$$

5.2.3.3 La pression osmotique Π

La pression osmotique Π appliquée sur les empilements de membranes par contrôle précis de l'humidité relative de l'air en équilibre avec l'échantillon est calculée selon la formule suivante, selon (Parsegian and Rand, 1995) :

$$\Pi = - \frac{k_b \times T_{sample}}{v_w^0} \times \ln \left(\frac{P}{P_0} \right) \quad (2)$$

où :

- k_b est la constante de Boltzmann ($k_b = 1,38.10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)
- T_{sample} est la température de l'échantillon
- v_w^0 est le volume moléculaire de l'eau ($v_w^0 = 30 \text{ \AA}^3$)
- P/P_0 est l'humidité relative (RH) mesurée

L'erreur $\delta \Pi$ associée à la pression osmotique est calculée par :

$$\delta \Pi = \sqrt{\delta T_{sample}^2 + \delta RH^2} \quad (3)$$

5.2.4 Géométrie et paramètres de l'instrument D16

5.2.4.1 Pour l'expérience de diffraction de neutrons

L'instrument D16 (Cristiglio et al., 2015) utilise un monochromateur à graphite pyrolytique hautement orienté (HOPG) composé de neuf cristaux dont l'orientation peut être réglée pour focaliser

le faisceau de neutrons verticalement et de manière continue vers l'échantillon. Le monochromateur est situé à une distance de 2,8 m de l'échantillon. La longueur d'onde du faisceau de neutrons est de $\lambda = 4,47 \text{ \AA}$ pour toutes les acquisitions. Les fentes de collimation sont ouvertes à la taille de l'échantillon pour maximiser le flux incident de neutrons sur toute la surface de l'échantillon, ici $3.10^7 \text{ N.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le détecteur à 2-dimensions à hélium ^3He (MILAND) est placé à une distance de 950 mm de l'échantillon, à un angle de 12° par rapport au faisceau incident. La surface de détection est de $320 \times 320 \text{ mm}^2$ avec une résolution de $1 \times 1 \text{ mm}^2$.

Le faisceau de neutrons incident illumine l'échantillon avec un angle d'incidence ajustable, noté Ω . Le faisceau est diffracté par l'échantillon dans diverses directions à des angles notés 2θ (Figure 25). A chaque angle d'incidence Ω , l'intensité dépendante de l'angle de diffraction 2θ est mesurée par le détecteur. En faisant tourner la platine, sur laquelle est positionnée la chambre de l'échantillon, et donc en variant pas à pas l'angle d'incidence Ω , des scans à 2-dimensions de l'intensité en fonction de l'angle d'incidence Ω et de l'angle de diffraction 2θ sont enregistrés, comme décrit dans des études précédentes (Schneck et al., 2011, 2008). Les scans Ω sont collectés par pas de $0,05^\circ$ entre -1 et 15° . Avec cette méthode, l'intensité est normalisée à la sensibilité des pixels du détecteur et à l'aire d'échantillon illuminée.

Les angles Ω et 2θ sont associés avec des coordonnées de l'espace réciproque, $q_{||}$ et q_z , les composants parallèle et perpendiculaire du vecteur de diffraction, respectivement, selon les relations géométriques suivantes :

$$q_{||} = (2\pi/\lambda)[\cos(2\theta - \Omega) - \cos(\Omega)] \quad (4)$$

et

$$q_z = (2\pi/\lambda)[\sin(2\theta - \Omega) + \sin(\Omega)] \quad (5)$$

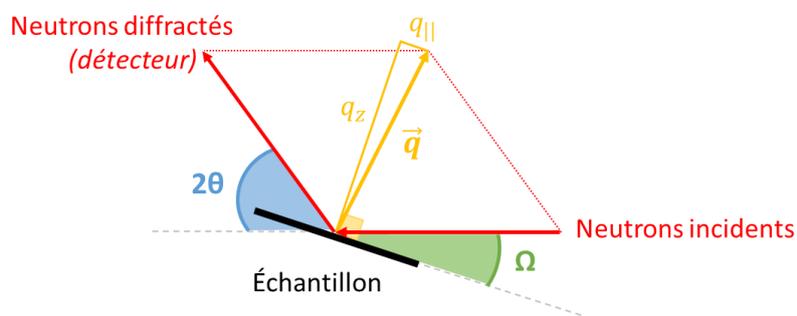


Figure 25. Géométrie de l'instrument vue du dessus. Les neutrons incidents arrivent à l'échantillon avec un angle Ω (vert), avant d'être diffractés avec un angle 2θ (bleu) par l'échantillon. Le vecteur de diffraction \vec{q} (jaune) est associé aux coordonnées dans l'espace réciproque q_z et $q_{||}$ (jaune).

Sur un scan de diffraction $I(2\theta, \Omega)$ (Figure 26), plusieurs informations sur la structure de l'échantillon peuvent être déterminées, notamment :

- la périodicité de l'échantillon (structure répétitive dans la direction perpendiculaire au plan des membranes) est déterminée grâce à la position des pics de diffraction, nommés pic de Bragg, le long de la ligne spéculaire (lorsque $\theta = \Omega$)
- l'intensité des pics de Bragg
- la diffusion dite diffuse autour de chaque pic de Bragg (lorsque $\theta \neq \Omega$), donne des informations sur les fluctuations dans la direction parallèle au plan des membranes, comme les fluctuations spatiales d'auto- et d'inter-corrélation (Salditt, 2005; Schneck et al., 2011)

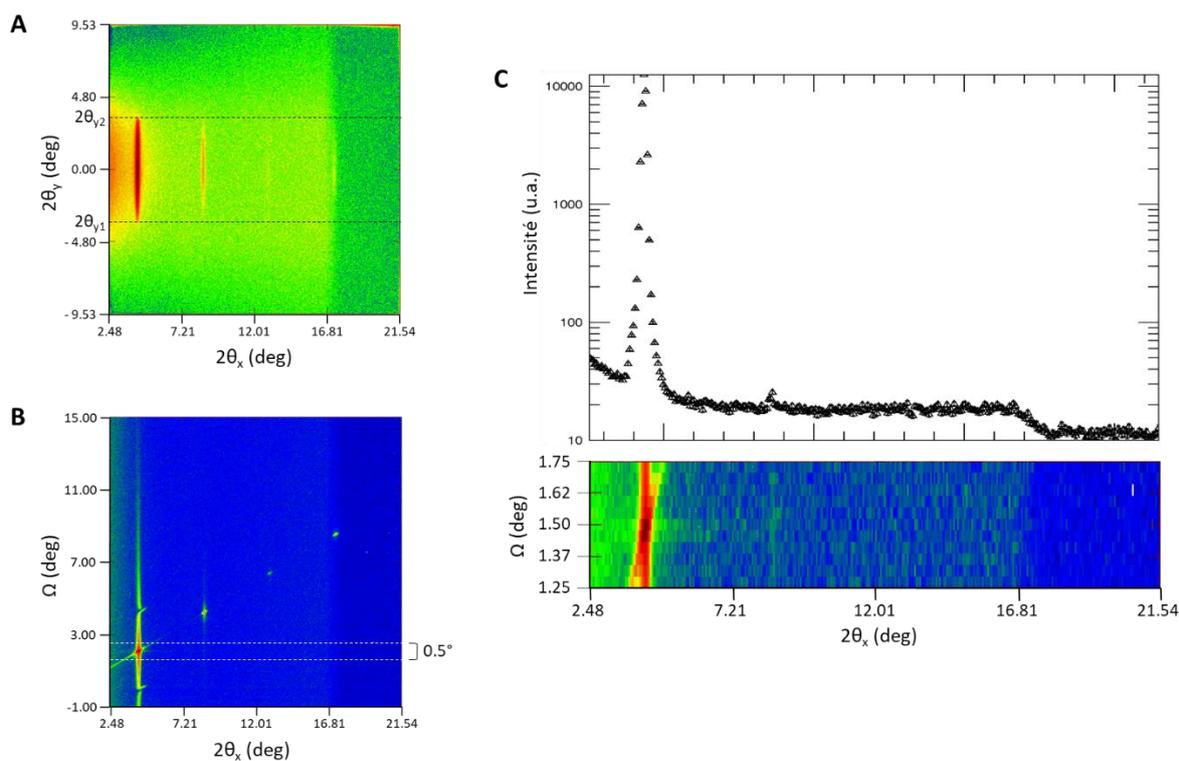


Figure 26. Les scans de diffraction des neutrons permettent de déterminer la périodicité de l'échantillon, grâce à la position des pics de Bragg (A et B), et les fluctuations membranaires grâce à la diffusion latérale (B). **A.** Scan de diffraction $I(2\theta_x, 2\theta_y)$ obtenu par somme de tous les scans aux différents angles d'incidences Ω (tous les $0,05^\circ$ de -1 à 15°). Pour l'analyse, le scan est délimité sur l'axe $2\theta_y$ à une zone de $2\theta_{y1}$ à $2\theta_{y2}$ (pointillés noirs), limitant le bruit de fond lors de la projection. **B.** Scan de diffraction $I(2\theta, \Omega)$ obtenu par projection après réduction à la zone de $2\theta_{y1}$ à $2\theta_{y2}$. **C.** Chaque pic de Bragg est analysé par réduction du scan $I(2\theta, \Omega)$ à une zone d'intérêt dans une gamme Ω de $0,5^\circ$ (11 pas de $0,05^\circ$) centré au niveau du pic de Bragg (en bas), correspondant à la zone délimitée par les pointillés blancs sur la partie B. La réduction des données en 1D permet d'avoir accès à la position et l'intensité du pic de Bragg par fit après sommation de l'intensité (en haut).

5.2.4.2 Diffusion aux petits angles (SANS)

Pour les expériences de SANS, également réalisées avec l'instrument D16, une géométrie « pinhole » a été obtenue en collimatant les neutrons horizontalement et verticalement pour produire un faisceau symétrique dans les deux directions. L'échantillon liquide, préparé selon le protocole décrit en section 5.2.1, est déposé dans une cellule de quartz de 1 mm (Hellma, Allemagne). Les deux principales différences par rapport aux films lipidiques sont : la perte de l'orientation de l'échantillon par rapport au faisceau incident, et la présence d'eau en excès dans le système. Le signal mesuré est donc une moyenne équiprobable de toutes les orientations des membranes dans l'échantillon. Dans ces conditions, l'espacement d mesuré à partir de l'anneau de Debye-Scherrer sur le profil SANS, donne le gonflement maximal des empilements membranaires en équilibre avec l'excès de D_2O . Le gonflement maximal est l'état d'équilibre thermodynamique dans lequel les forces répulsives et attractives, agissant sur les membranes s'annulent. Une fois cet équilibre atteint, l'ajout d'eau ne modifie plus la période de la phase lamellaire et ne produit que de l'eau en excès.

5.2.5 Réduction des données

Les scans Ω sont analysés à l'aide du logiciel LAMP, développé à l'ILL (Richard et al., 1996). Avant de réduire les données à 1 dimension, chaque pas du scan, collecté par le détecteur à un angle Ω donné, est normalisé à la calibration du détecteur prenant en compte l'efficacité et l'angle solide des pixels du détecteur. Ensuite, les images 2D $I(2\theta_x, 2\theta_y)$ sont délimités sur l'axe $2\theta_y$ par à une zone allant de $2\theta_{y1}$ à $2\theta_{y2}$, correspondant à la hauteur des pics de Bragg, augmentant le rapport signal diffusé/bruit de fond, en excluant la zone où aucune intensité n'est détectée lors de la projection (*Figure 26.A*). Après projection de cette zone réduite, chaque pas est réduit à 1 dimension et le scan $I(2\theta, \Omega)$ est obtenu, où chaque pic de Bragg est analysé par réduction de la zone d'intérêt à une gamme Ω de $0,5^\circ$ (11 pas de $0,05^\circ$) centré sur le pic de Bragg (*Figure 26.B et C bas*). La position du pic de Bragg et son intensité sont déterminées par fit après sommation de l'intensité (*Figure 26.C haut*). La forme du fit est une Gaussienne et une fonction quadratique a été utilisée pour ajuster le bruit de fond. Enfin, la loi de Bragg permet de calculer la périodicité lamellaire d selon :

$$2d\sin\theta_B = n\lambda \quad (6)$$

où :

- θ_B est le demi-angle du pic de Bragg étudié
- n est l'ordre de diffraction ($n = 1$ pour le pic de Bragg 1, etc.)
- λ est la longueur d'onde du faisceau de neutrons ($\lambda = 4,47 \text{ \AA}$)

Une régression linéaire des points obtenus sur le graphique $2\sin\theta$ vs n , permet d'avoir accès à la valeur de la période d du système étudié à partir de la pente $s = \lambda/d$ (Figure 27). L'erreur δd associée à la période d est donnée par propagation de l'erreur sur la pente de la régression linéaire.

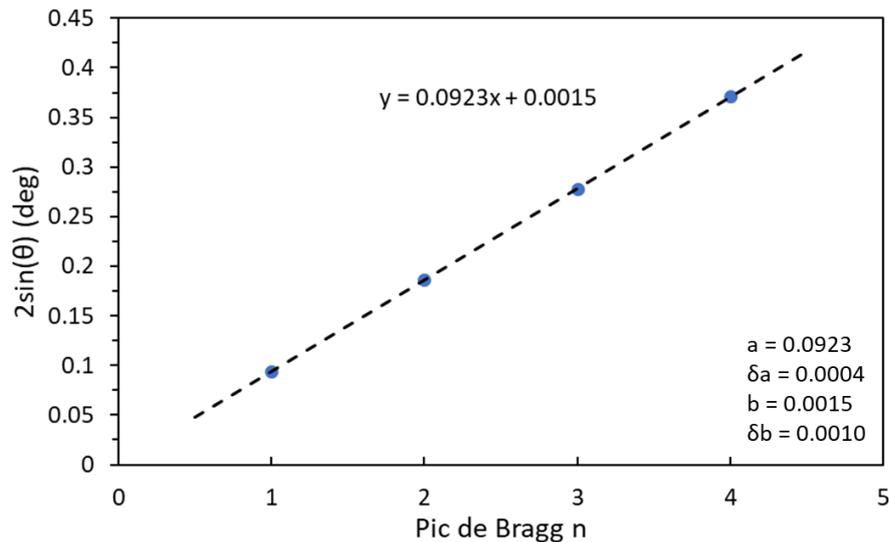


Figure 27. Exemple de régression linéaire des points $f(2\sin\theta; n)$ pour déterminer de la période d des membranes. La pente de la droite de régression $s = \lambda/d$. Ici, 4 ordres de diffraction étaient visibles sur le scan.

5.2.6 Profils de densité de longueur de diffusion des neutrons (NSLD)

5.2.6.1 Construction du profil NSLD

Les profils de densité ou NSLD, sont calculés à partir des intensités intégrées des pics de Bragg. Ces intensités sont le reflet de la modulation des facteurs de structure discrets à chaque ordre (pics de Bragg), par le facteur de forme membranaire sous-jacent qui n'apparaît pas directement dans les données. Le facteur de structure est la conséquence des corrélations dans l'espace des membranes entre elles. Le facteur de forme est la résultante des corrélations de longueur de diffusion dans la membrane. Communément, une distinction est donc faite entre les corrélations de longueur de diffusion inter-membranaire (facteur de structure) et intra-membranaire (facteur de forme). Quelles que soient la géométrie et la technique de diffusion des neutrons utilisées, c'est toujours le produit des deux qui est mesuré. Ici, les intensités des pics de Bragg sont corrigées pour prendre en compte l'absorption des neutrons C_{abs} et la correction du facteur de Lorentz C_{Lor} d'après (Harroun et al 2008). Il en résulte un facteur de structure discret corrigé pour chaque valeur d'intensité de diffraction I_n à l'ordre n .

$$|F_n|^2 = C_{\text{abs}} C_{\text{Lor}} I_n \quad (7)$$

Avec,

$$C_{\text{abs}} = \frac{\alpha}{1 - e^{-\alpha}}, \quad \alpha = \frac{2\mu t}{\sin \theta} \quad (8)$$

$$C_{\text{Lor}} = \sin(2\theta) \quad (9)$$

où :

- μ est le coefficient d'absorption de l'échantillon ($\mu = 5 \text{ cm}^{-1}$)
- t est l'épaisseur de l'échantillon calculée à partir du volume lipidique et de la surface de l'échantillon ($t = 5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}$)

La transformation de Fourier du facteur de structure permet de construire la NSLD (Worcester et Franks, 1976), selon la formule suivante :

$$\rho(z) = \frac{2}{d} \sum v_n F_n \cos\left(\frac{2\pi n z}{d}\right) \quad (10)$$

où :

- z est la direction perpendiculaire au plan des bicouches
- v_n est la phase du facteur de structure ($v_n = \pm 1$)

Différentes hypothèses sur les signes de chaque facteur de structure discret ont été testées pour obtenir un profil de SLD centro-symétrique avec, (1) un minimum à $z = 0$, correspondant au centre de la bicouche, où la densité des hydrogènes est importante due aux groupements méthyls terminaux des chaînes d'acides gras, et (2) un maximum dans la région de la tête polaire des lipides (*Figure 28*), riche en carbone et en hétéroatomes (O, N, P) de densité de longueur de diffusion élevée. Les phases assignées donnant le meilleur profil en accord avec les contraintes précédemment citées et d'après la littérature, sont -, -, +, - (Pan et al 2012).

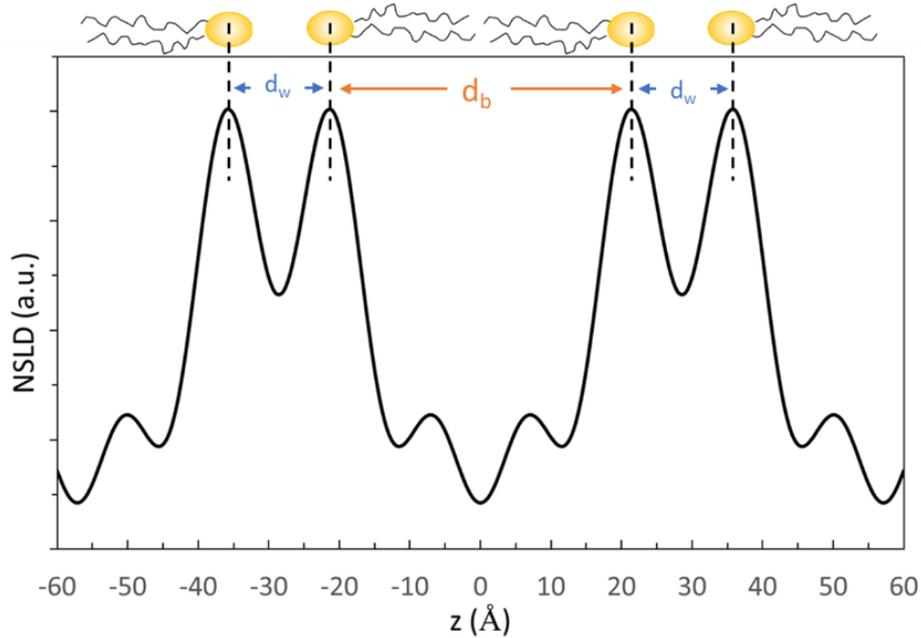


Figure 28. Profil NSLD (*Neutron Scattering Length Density*) d'une membrane de lipides obtenu avec un solvant de contraste à 8 % D₂O et les phases -, -, +, -. Le profil est centro-symétrique avec un minimum à $z = 0$ pour les extrémités des acides gras riches en H, et des valeurs maximales au niveau des têtes polaires (schématisées par les cercles jaunes) riches en carbone et hétéroatomes (O, N, P). L'épaisseur de la bicouche d_b est déterminée par la distance centre à centre des têtes polaires des lipides, de part et d'autre de $z = 0$ (orange). L'épaisseur de la couche d'eau est la distance centre à centre des têtes polaires, de chaque côté de l'axe $z = 0$ (bleu).

5.2.6.2 Calculs des épaisseurs de bicouche et de couche d'eau

Les épaisseurs de bicouche d_b et de couche d'eau d_w sont calculées à partir du profil NSLD (Figure 28). Dans ce projet, la distance du centre à centre des têtes polaires des lipides a été choisie comme définition de l'épaisseur de la bicouche. Cette distance est calculée à partir du fit des positions des têtes polaires (pics maximum) sur le profil NSLD. L'erreur δd_b associée à l'épaisseur de la bicouche est calculée par le carré de la différence entre la valeur calculée par NSLD (V_{NSLD}) et la valeur mesurée par le fit (V_{fit}) :

$$\delta d_b = (V_{\text{NSLD}} - V_{\text{fit}})^2 \quad (11)$$

L'épaisseur de la couche d'eau d_w est calculée à partir de la périodicité et de l'épaisseur de la bicouche par :

$$d_w = d - d_b \quad (12)$$

L'erreur δd_w associée à l'épaisseur de la couche d'eau est calculée par :

$$\delta d_w = \sqrt{\delta^2 d + \delta^2 d_b} \quad (13)$$

6 Analyse phylogénique l'enzyme de synthèse du DGTS

Cette analyse phylogénétique a été réalisée en collaboration avec Alberto Amato et Olivier Bastien travaillant dans l'équipe au CEA.

6.1 Ensemble de données pour l'analyse phylogénique

Le locus Naga_100016g36 de *Microchloropsis gaditana* (annoté comme protéine de fonction inconnue DUF3419) a été identifié comme une bétaine lipide synthase putative par homologie avec *Nannochloropsis oceanica* BTA1 (Murakami et al., 2018). La séquence codante (CDS) de Naga_100016g36 a été traduite et la séquence d'acides aminés a été utilisée comme requête pour une série de recherches BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dans toutes les bases de données accessibles au public.

Un tBLASTn et un PSI-BLAST (*position-specific iterated BLAST*) (Altschul, 1997; Altschul et al., 2005) ont été effectués afin d'obtenir un ensemble large de données. Un tBLASTn consiste à lancer une recherche d'une séquence de protéine contre une base de données de séquences nucléotidiques traduites en séquences de protéines avec les six cadres de lecture (3 dans le sens de lecture 5'→3' et 3 dans le sens de lecture 3'→5'). L'algorithme PSI-BLAST permet de relancer un BLAST plusieurs fois par itération, puis à chaque itération, une séquence consensus est déterminée à partir des résultats, et utilisée comme séquence source pour l'itération suivante. Cette recherche a été réalisée de la même manière sur les séquences fournies dans l'article de (Murakami et al., 2018).

L'ensemble de données final contenait des séquences d'acides aminés provenant d'au moins 14 familles d'eucaryotes, de bactéries et d'archées. Étant donné que, chez la plupart des eucaryotes, les deux domaines de la protéine BTA (le domaine de la 3-amino-3-carboxypropyl-transférase et le domaine de la méthyltransférase dépendante de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM)) sont disposés dans deux configurations différentes, deux alignements distincts ont été produits.

6.2 Alignement des séquences de l'ensemble des données

Les séquences d'acides aminés des deux domaines ont été compilées dans deux fichiers distincts au format fasta, et alignées à l'aide de MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) (Edgar, 2004), puis traitées à l'aide du logiciel BMGE (*Block Mapping and Gathering with Entropy*) (Criscuolo and Gribaldo, 2010), afin de sélectionner les régions phylogénétiquement informatives. Pour chaque alignement, le modèle de substitution qui correspond le mieux aux données

a été sélectionné en exécutant l'utilitaire « Find Best DNA/Protein Model » mis en œuvre dans le logiciel MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetics Analyses*) (Kumar et al., 2018).

Le modèle de substitution de Le-Gascuel pour la méthode d'inférence phylogénétique de *Maximum Likelihood* (ML, maximum de vraisemblance) a été choisi comme étant le mieux adapté pour les deux ensembles de données (Le and Gascuel, 2008). Le long d'une séquence nucléique, certains sites peuvent être invariants et d'autres à l'inverse hypervariants. Afin de prendre en compte cet élément, il est nécessaire de modéliser la variabilité des taux de substitution à l'aide d'une distribution Gamma discrète (+G). Pour l'alignement du domaine SAM, une certaine fraction des sites a été considérée comme invariable du point de vue évolutif (+I).

6.3 Construction des arbres phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques ML ont été soutenues par 5000 pseudo-réplicats (bootstrap). Une valeur de « bootstrap » (pourcentage de 0 à 100 %) est associée à chaque branche de l'arbre indiquant le nombre de fois où cette branche a été retrouvée au fil des répétitions et permet de juger ainsi de leur crédibilité. Les arbres initiaux pour la recherche heuristique (approche permettant de trouver un maximum local sans garantir qu'il s'agisse du maximum absolu) ont été obtenus automatiquement en appliquant les algorithmes Neighbor Joining (NJ) et BioNJ à une matrice de distances par paires estimées à l'aide d'un modèle JTT (*Jones, Taylor et Thornton*) (Jones et al., 1992), puis en sélectionnant la topologie de l'arbre présentant la valeur de vraisemblance logarithmique supérieure. Toutes les positions avec une couverture de site inférieure à 95 % ont été éliminées. Les arbres ont été dessinés à l'échelle, la longueur des branches étant mesurée en nombre de substitutions par site.

6.4 Analyse bayésienne

Afin de déduire à la fois l'histoire de la fusion et l'habitat des organismes possédant un gène BTA, une inférence bayésienne a été réalisée à l'aide de MrBayes v3.2.7 (Ronquist et al., 2012b; Ronquist and Huelsenbeck, 2003) en utilisant un modèle partitionné (Ronquist et al., 2012a). Après quelques essais, les conditions de l'analyse bayésienne ont été définies de manière à ce que l'écart-type moyen des fréquences fractionnées atteigne un état stationnaire au cours de l'échantillonnage. Pour chaque analyse, un total de 1 600 000 générations a été mis en œuvre, les échantillons successifs étant séparés par 100 générations après une période initiale de « rodage » de 25 % du nombre

d'échantillons. Les probabilités bayésiennes postérieures (BPP) ont été estimées par deux analyses parallèles et indépendantes guidées par quatre chaînes (dont une « chaude ») couplées de Markov (*Metropolis-Coupled Markov Chain Monte Carlo*, MCMCMC). Plus le nombre de pas effectué par la chaîne est important, plus l'estimation est exacte. Pour chaque ensemble de données, la sélection du modèle a été faite pendant l'analyse, en estimant les probabilités postérieures des différents modèles ainsi que leurs paramètres. L'habitat de chaque organisme a été pris en compte comme une variable dans l'analyse bayésienne.

Résultats

PARTIE 1 :
Etudes des lipides des
microalgues chez *Phaeodactylum*
tricornutum* et *Microchloropsis
gaditana

Chapitre 1 :

Etude des bétaines lipides dans les membranes des microalgues

1 Préambule

Comme expliqué dans la partie bibliographique (section 1.2.3), les bétaines lipides sont au nombre de trois DGTS, DGTA et DGCC. Alors que le DGTS est présent dans les plantes ne produisant pas de graines, telles les mousses, les fougères, les trois bétaines lipides sont présents dans les algues (Sato, 1992). Par exemple, le DGTS est retrouvé dans la microalgue *Microchloropsis gaditana*, le DGTA dans *Phaeodactylum tricornutum* et le DGCC dans *Thalassiosira pseudonana* (Cañavate et al., 2016; Guschina and Harwood, 2006). En revanche, les angiospermes et les gymnospermes, qui sont des plantes produisant des graines, ne contiennent pas de bétaines lipides. En carence en phosphate, alors que les quantités de phospholipides diminuent pour remobiliser le phosphate, il est noté que la quantité de bétaines lipides, non-phosphorés, augmente dans la cellule (Abida et al., 2015). Les bétaines lipides sont zwitterioniques et ont une structure très proche de celle de la PC (Figure 29), laissant supposer que le remplacement de la PC par un bétaine lipide dans les membranes en carence de phosphate est possible, tout en conservant un rôle similaire pour garder l'architecture de la membrane intacte. En revanche, ces lipides ont récemment été découverts, et n'ont pas encore été étudiés et très peu de données sont disponibles dans la littérature. C'est pourquoi dans ce chapitre, l'organisation des membranes biomimétiques de DGTS et de DGTA extraits des deux microalgues modèles a été étudiée par diffraction de neutrons en comparaison avec la PC extraite de *Phaeodactylum tricornutum*.

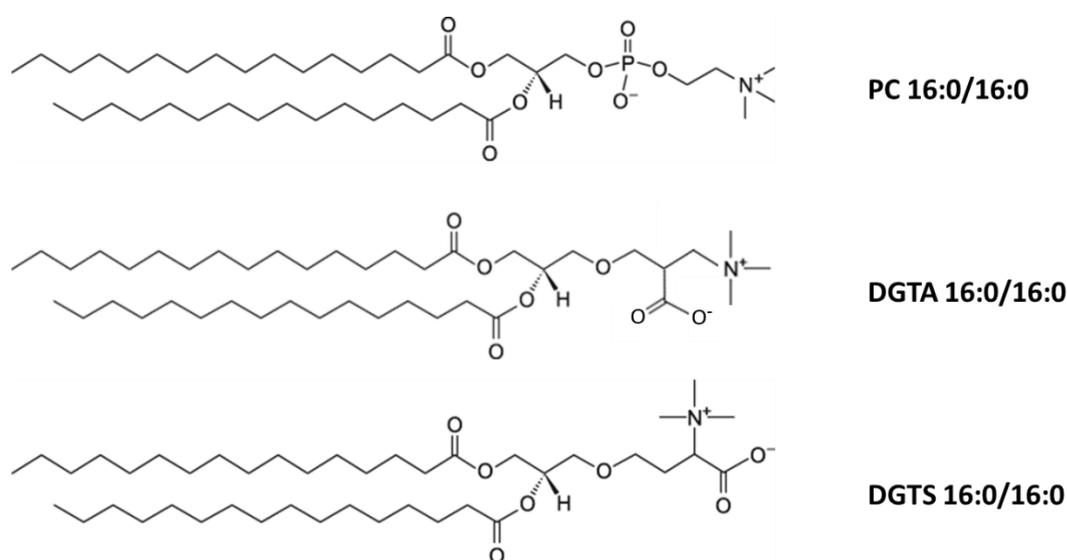


Figure 29. Structures de la PC, du DGTA et du DGTS. Les trois lipides sont zwitterioniques : la charge négative est portée par le groupement phosphate dans la PC, et par le groupement carboxyl dans les deux bétaines lipides, et la charge positive est portée par groupement tétraméthylammonium pour les trois lipides. **PC** : phosphatidylcholine, **DGTA** : 1,2-diaclyglycéril-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)- β -alanine, **DGTS** : 1,2-diaclyglycéril-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homosérine.

2 Résultats préliminaires sur les lipides naturels

DOI expérience : 10.5291/ILL-DATA.8-02-820

Les données numériques sont présentées en Annexes de ce manuscrit

2.1 Composition en acides gras du DGTS, du DGTA et de la PC

Après extraction et séparation des lipides par chromatographie (section 4.2.2 et 4.3), la PC et le DGTA de *Phaeodactylum tricornutum* et le DGTS de *Microchloropsis gaditana* sont analysés par GC-FID et spectrométrie de masse (section 4.5.2 et 4.6). Ainsi, la composition en acides gras a pu être déterminée, donnant accès aux longueurs de chaîne et au nombre d'insaturations (Figure 30).

Ce qui est remarquable dans la répartition des couples d'acides gras (Figure 30.A), c'est la forte teneur en 32:1 (35 %) dans le DGTS extrait de *Microchloropsis gaditana*. Cette somme correspond au couple d'acides gras 16:0/16:1. Le DGTS est aussi composé d'un fort taux de 40:9 (20:5/20:4) et 40:10 (20:5/20:5) à environ 15 et 20 % respectivement. Ce lipide contient donc environ 50 % des acides gras à courtes chaînes et des acides gras à très longues chaînes, mais très peu de chaînes à 18 carbones (Figure 30.B). Cette répartition est également visible en Figure 30.C, où le pourcentage des acides gras en fonction du nombre d'insaturations est représenté. En effet, 50 % des acides gras du DGTS sont des acides gras polyinsaturés (PUFA), et 40 % correspondent au couple d'un acide gras mono-insaturé avec un acide gras saturé (MUFA/SFA). Les lipides de *Phaeodactylum tricornutum* contiennent toutes les sommes d'acides gras, avec une forte proportion d'acides gras à longues chaînes polyinsaturées (83 % pour le DGTA et 93 % pour la PC). Le couple 20:5/20:5 (40:10) représente 18 % chez la PC. Ensuite, il est intéressant de noter que le DGTA est le seul des trois lipides étudiés portant deux acides gras saturés (DSFA) en très faible quantité (5 %). Ces molécules sont également visibles sur le diagramme de répartition, avec les sommes 30:0 et 32:0, correspondant respectivement aux couples 16:0/14:0 et 16:0/16:0. Des analyses de la composition en acides gras de la PC de *Microchloropsis gaditana* montrent qu'elle ne contient pas de longues chaînes carbonées supérieures à 18 carbones, avec principalement les couples 16:0/18:1 (30 %), 16:0/18:2 et 16:1/18:1 (33 %) (Jouhet et al., 2017).

Ainsi, les analyses montrent que les lipides extraits de *Phaeodactylum tricornutum* ont une répartition similaire en termes de longueur de chaîne et de nombre d'insaturations, mais ont une composition particulière, avec la présence des DSFA dans le DGTA. En revanche, le DGTS a une composition différente de celle des deux autres lipides, indiquant que chaque organisme a une composition qui lui est propre.

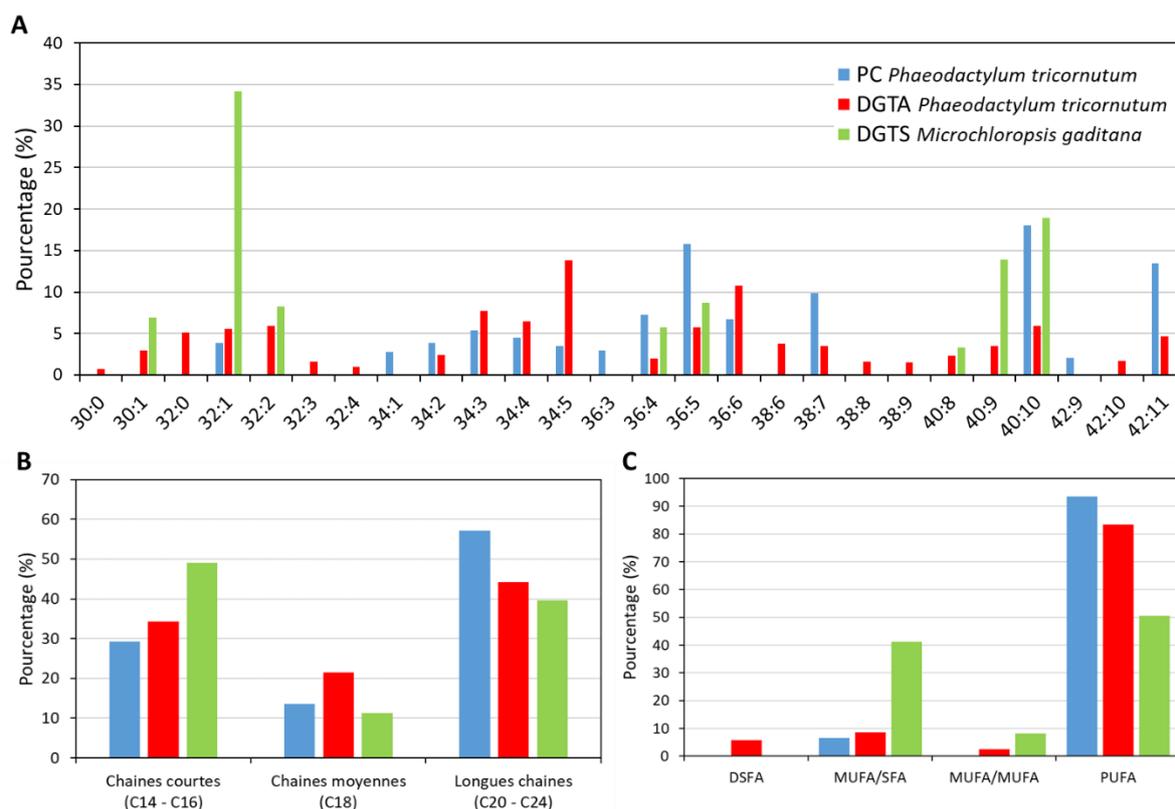


Figure 30. Composition en acides gras de la PC et du DGTA de *Phaeodactylum tricornutum* (respectivement en bleu et rouge) et du DGTS de *Microchloropsis gaditana* (en vert), analysée par spectrométrie de masse et GC-FID. (A) Pourcentage des couples d'acides gras présents pour chaque lipide. (B) Répartition des acides gras selon la longueur de la chaîne carbonée. (C) Répartition des acides gras selon le nombre d'insaturations. DSFA : Double Saturated Fatty Acid (0 insaturation), MUFA : Mono-Unsaturated Fatty Acid (1 insaturation), PUFA : Poly-Unsaturated Fatty Acid (> 1 insaturation), SFA : Saturated Fatty Acid (0 insaturation).

2.2 Organisation des membranes de bétaines lipides

Les films de lipides étudiés par diffraction de neutrons sont composés d'un seul lipide : soit la PC de *Phaeodactylum tricornutum*, soit un bétaine lipide naturel (DGTA ou DGTS). Les films sont déposés sur un wafer en silicium, et l'analyse est faite avec un contraste à 100 % D₂O. S'agissant de lipides naturels, la température de l'échantillon est maintenue à 25°C, où les acides gras sont en phase fluide. La gamme d'humidité de 30 à environ 100 % est parcourue avec des temps d'équilibre entre chaque mesure, comme décrit dans le matériel et méthode (section 5.2.3.2). Les images de diffraction $I(2\theta_x, 2\theta_y)$ à faible humidité et les scans $I(2\theta_x, \Omega)$ à forte humidité sont présentés en Figure 31.

A faible humidité (RH = 30 %), un seul pic de Bragg est présent sur les images détecteur des membranes de PC et de DGTA. Cela signifie donc que les membranes sont peu ordonnées, malgré la présence d'un pic de Bragg bien défini. L'ordre ne se propage pas au-delà de la corrélation entre les premiers voisins, il est donc impossible de savoir s'il s'agit d'une phase lamellaire, micellaire ou autre. Il se pourrait également qu'il s'agisse d'une phase lamellaire masquée par une phase amorphe sans

organisation particulière. En revanche, à faible humidité, le DGTS adopte une organisation hexagonale. La composition en acides gras a montré que le DGTS est composé de deux groupes de molécules : 16:0/16:1 à 35 %, et les couples 20:5/20:4 et 20:5/20:5, dont la somme représente 35 %. Cette composition particulière n'étant pas retrouvée chez la PC et le DGTA, elle pourrait être responsable de cette organisation hexagonale à faible humidité. Avec l'augmentation de l'humidité, une coexistence entre une phase hexagonale et une phase lamellaire est visible. Ensuite, à plus forte humidité (RH = 75 %), les trois lipides adoptent une organisation lamellaire, confirmée par la présence de deux ordres de diffraction, indexable 1 et 2, le premier étant le premier pic de Bragg (le plus intense).

A partir de RH = 94 %, deux phases sont présentes dans les membranes de DGTA, ce qui n'est pas repéré chez les autres lipides. Cela pourrait s'expliquer par une différence de composition en acides gras des molécules de DGTA, comme le montre Luchini et al. dans son étude sur la PC et le PG naturels de la levure ou d'*Escherichia coli* respectivement (Luchini et al., 2021). Ce n'est qu'à partir de cette humidité là qu'une différence de période peut être distinguée. Le DGTA est le seul lipide ayant deux acides gras saturés (DSFA) (*Figure 30.C*). Aucune donnée sur le DGTA n'a été trouvée dans la littérature. En revanche, des études se sont portées sur le DGTS, et il est reporté que la température de transition de phase du DGTS 16:0/18:0 est à 53,1°C (Sato and Murata, 1991). Par une analyse calorimétrique présentée dans l'étude en section 3 de ce chapitre, nous avons déterminé la température de transition de phase du DGTS 16:0/16:0 à 43,8°C. De plus, le DGTS et le DGTA étant des isomères structuraux, il est possible que la température de transition de phase du DGTA 16:0/16:0 n'est peut-être pas très éloignée de celle déterminée pour le DGTS. Ainsi, en plaçant notre échantillon à 25°C, la transition de phase de ces molécules saturées n'est probablement pas atteinte et donc qu'elles soient toujours en phase gel au moment de l'analyse. Une différence entre des acides gras en phase gel et des acides gras en phase fluide peut être visible en diffraction de neutrons. En effet, l'épaisseur de la bicouche diminue avec l'augmentation de la température du fait de la fusion des chaînes d'acides gras (Kučerka et al., 2011). Des lipides avec des chaînes d'acides gras en phase gel sont plus grands par rapport à des lipides dont les acides gras sont en phase fluide. Cela est cohérent avec ce qui est observé sur l'image de diffraction, où le pic de Bragg le plus intense pourrait correspondre à la phase majoritaire, à savoir les molécules de DGTA insaturées, et un signal plus faible vers les petits angles, et donc grande période, qui pourrait correspondre aux molécules saturées (DSFA) ne représentant que 5 % des lipides totaux.

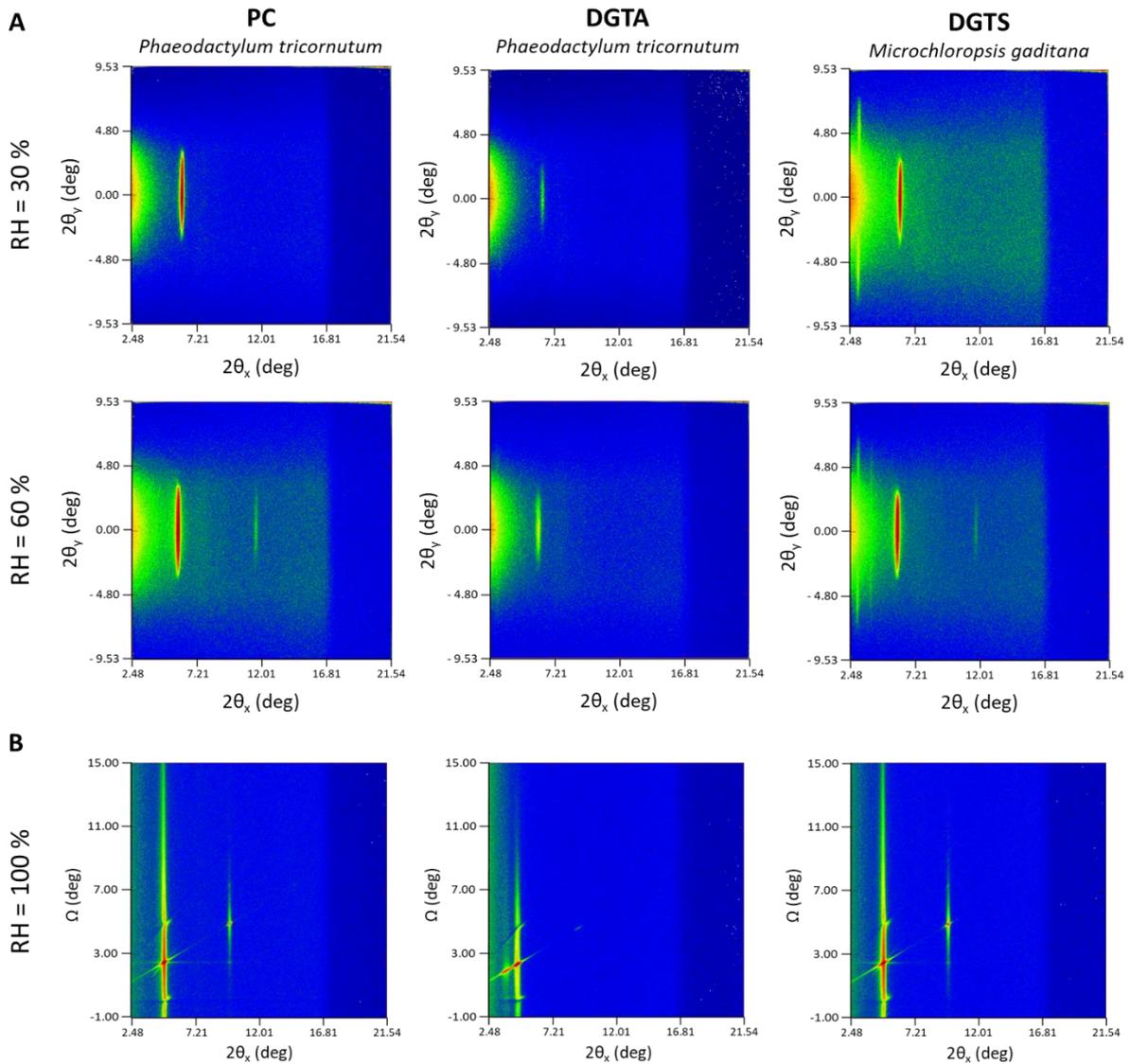


Figure 31. (A) Les images de diffraction $I(2\theta_x, 2\theta_y)$ montrent l'organisation de trois lipides à faible humidité. Le DGTS de *Microchloropsis gaditana* présente une organisation hexagonale, alors que la PC et le DGTA de *Phaeodactylum tricornutum* sont lamellaires. (B) Les scans de diffraction $I(2\theta_x, \Omega)$ montrent deux ordres de diffraction pour les trois lipides. Deux phases sont présentes dans la membrane de DGTA. Les analyses ont été faites à un contraste de 100 % D₂O, à 25°C. Valeurs des humidités relatives : 30,1, 49,9 et 99,9 % pour la PC, 30,3, 60,0 et 98,7 % pour le DGTA, et 30,2, 60,6 et 99,9 % pour le DGTS.

2.3 Périodicité des membranes

La période d de chaque membrane est calculée selon la loi de Bragg. Le graphique suivant montre l'évolution de la période en fonction de l'humidité (Figure 32). La période évolue de la même manière pour les trois membranes avec l'hydratation, en atteignant un maximum vers 54 Å à forte hydratation. A cette humidité, le film de DGTA a deux phases distinctes, la période de l'une d'elles est mesurée à 70 Å (donnée non montrée). Comme expliqué précédemment, cette phase est probablement composée de molécules de DGTA portant majoritairement deux acides gras saturés,

donc en phase gel. A partir de la période, il est possible de calculer la longueur de décroissance de la pression, qui aux courtes distances inter-membranaires, est dominée par les forces d'hydratation et de la compression des membranes selon (Kowalik et al., 2017). Elle est calculée à partir de la régression linéaire des données, selon la formule $\Pi = \Pi_0 e^{-d/\lambda}$, en représentation logarithmique, avec d la période et λ la longueur de décroissance. La longueur de décroissance de la pression des bétaines lipides est quasiment identique avec $\lambda_{\text{DGTA}} = 7,2 \text{ \AA}$ et $\lambda_{\text{DGTS}} = 7,5 \text{ \AA}$, indiquant que les forces répulsives exercées sur les deux membranes sont similaires. En revanche, la longueur de décroissance de la PC est plus petite ($\lambda_{\text{PC}} = 5,5 \text{ \AA}$), montrant que les forces répulsives sont plus fortes pour les bétaines lipides. Les charges portées par les têtes polaires et les molécules d'eau d'hydratation ne sont pas réparties de la même manière entre les bétaines lipides et la PC. Ce changement pourrait être à l'origine des forces différentes appliquées à la membrane de PC.

Dans les données de la littérature, les longueurs de décroissance de la pression des phosphatidylcholines sont généralement aux alentours de 2 \AA , par exemple $1,7 \text{ \AA}$ pour la DPPC en phase fluide (Kowalik et al., 2017), $2,2$ ou $2,1 \text{ \AA}$ pour la DMPC respectivement (Lis et al., 1982; Wolde-Kidan et al., 2019), et $2,9 \text{ \AA}$ pour la POPC (Wolde-Kidan et al., 2019). En revanche, les lipides étudiés dans la littérature sont des lipides synthétiques purs avec des longueurs de chaînes d'acides gras très peu variables (C16, C18). Or, dans notre étude, la PC est extraite de *Phaeodactylum tricornutum*, le biphasé est formé avec des solvants contenant des ions, comme par exemple le Na^+ qui peut être un contre-ion à la PC, modifiant les charges et l'incorporation des molécules d'eau au niveau de la tête polaire. De plus, les acides gras ont des longueurs très diverses, avec une forte proportion de PUFA (93 %). Ces deux paramètres peuvent probablement entraîner des interactions entre les membranes différentes, pouvant expliquer la différence de longueur de décroissance de la pression par rapport aux données de la littérature.

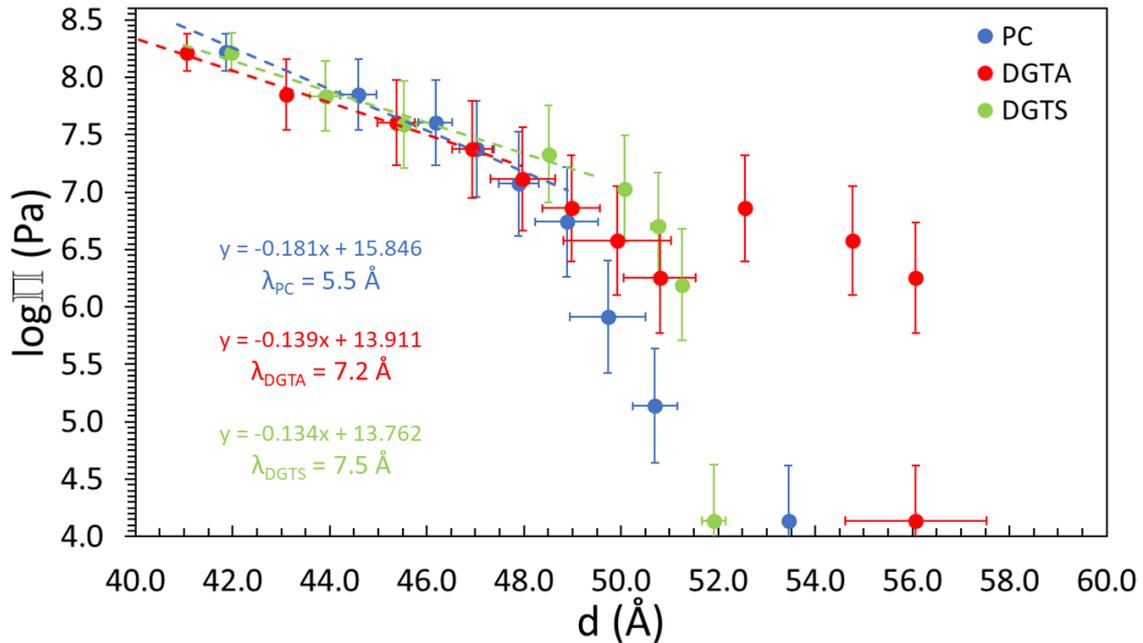


Figure 32. Comparaison de la période d des trois membranes mesurées à un contraste 100 % D₂O, à 25°C. Avec l'augmentation de l'humidité, la période évolue de manière similaire pour les trois membranes, atteignant un maximum vers 54 Å en moyenne. Les longueurs de décroissance de la pression sont du même ordre pour les membranes de bêtaines lipides ($\lambda_{DGTA} = 7,2 \text{ \AA}$ et $\lambda_{DGTS} = 7,5 \text{ \AA}$), mais plus petite pour la membrane de PC ($\lambda_{PC} = 5,5 \text{ \AA}$).

Dans cette étude, la comparaison de trois lipides dont les têtes polaires et la composition en acides gras est différente, montre que la période est très similaire suggérant donc un remplacement possible de la PC par un bêtaine lipide lors d'une carence en phosphate. En revanche, la présence de structure hexagonale dans les membranes de DGTS à faible humidité, et la présence d'une coexistence de phases bien distinctes dans les membranes de DGTA, sont deux observations particulières qui nécessitent d'être approfondies. En effet, il est difficile de conclure avec certitude s'il s'agit d'un effet des têtes polaires, dont les charges ne sont pas réparties de la même manière pour les trois lipides, pouvant donc créer des forces de répulsion différentes entre les membranes, ou alors de la composition en acides gras, plus ou moins riche en PUFA ou DSFA, entraînant des différences dans le bilan des forces s'appliquant aux membranes.

C'est pourquoi, afin de comprendre dans un premier temps uniquement l'impact de la tête polaire sur l'organisation de la membrane, l'étude a été menée sur des lipides synthétiques présentant deux acides gras 16:0. Le DGTA n'étant pas commercialisé, l'étude a été réalisée sur la PC 16:0/16:0 (DPPC) et le DGTS 16:0/16:0 (DP-DGTS). Ce travail a permis la rédaction d'un article, ouvrant sur des hypothèses évolutives de l'absence du DGTS dans les membranes des plantes à graines.

3 Résultats de l'étude des membranes de DPPC et de DP-DGTS

Article 1 : Evolutionary significance of the betaine lipid DGTS bilayer properties in betaine lipid disappearance in seed plants.

BOLIK Stéphanie^{1,2}, SCHLAICH Alexander^{3,4}, MUKHINA Tetiana⁵, DERAGON Etienne¹, AMATO Alberto¹, BASTIEN Olivier¹, SCHNECK Emanuel⁵, DEMÉ Bruno², and JOUHET Juliette¹.

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG, LPCV, 38000, Grenoble, France.

² Institut Laue-Langevin, 38000, Grenoble, France.

³ Institute for Computational Physics, Universität Stuttgart, Allmandring 3, 70569 Stuttgart, Germany

⁴ Stuttgart Center for Simulation Science (SimTech), Universität Stuttgart, Universitätsstraße 32, 70569 Stuttgart, Germany

⁵ Institute for Condensed Matter Physics, TU Darmstadt, Hochschulstraße 8, 64289 Darmstadt, Germany

N.B.1 : Cet article est encore en cours d'écriture

N.B.2 : La numérotation des figures est indépendante du manuscrit de thèse

N.B.3 : Les données numériques sont présentées en Annexes de ce manuscrit

Evolutionary significance of the betaine lipid DGTS bilayer properties in betaine lipid disappearance in seed plants

BOLIK Stéphanie^{1,2}, SCHLAICH Alexander^{3,4}, MUKHINA Tetiana⁵, AMATO Alberto¹, BASTIEN Olivier¹, SCHNECK Emanuel⁵, DEMÉ Bruno², and JOUHET Juliette¹.

Address:

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG, LPCV, 38000, Grenoble, France.

²Institut Laue-Langevin, 38000, Grenoble, France.

³Institute for Computational Physics, Universität Stuttgart, Allmandring 3, 70569 Stuttgart, Germany

⁴Stuttgart Center for Simulation Science (SimTech), Universität Stuttgart, Universitätsstraße 32, 70569 Stuttgart, Germany

⁵Institute for Condensed Matter Physics, TU Darmstadt, Hochschulstraße 8, 64289 Darmstadt, Germany

Corresponding author: juliette.jouhet@cea.fr

Financial sources:

This work was supported by ANR-DFG ANR-18-CE92-0015 and SCHN 1396/2. SB was supported by a joint funding Glyco@Alps / ILL PhD Program, by the French National Research Agency in the framework of the "Investissements d'avenir" program Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02), "Origin Of Life" (ANR-17-EURE-0003) and the Labex GRAL, financed within the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003). AS acknowledges funding from the DFG under Germany's Excellence Strategy – EXC 2075 – 390740016. Computing time was provided by the state of Baden-Württemberg through bwHPC.

Data Availability Statement:

The data that support the findings of this study are openly available at <http://doi.org/10.5291/ILL-DATA.8-02-820> and <http://doi.org/10.5291/ILL-DATA.TEST-3119> and at <https://doi.org/10.18419/darus-2360>.

Conflict of Interest Statement:

The authors declare no conflicts of interest

Author Contributions:

JJ, BD and ES conceived and designed the research; SB and BD performed the DSC and neutron experiments, TM performed the SAXS experiment, AS performed the molecular dynamic simulations, OB and AA did the phylogeny analysis. SB, BD, JJ, AS and ES analyzed and interpreted the data. All authors were involved in drafting and revising the manuscript.

Abstract:

Many organisms rely on mineral nutrients taken directly from the soil or aquatic environment, and therefore developed mechanisms to cope with the limitation of a given essential nutrient. For example, photosynthetic cells have well-defined responses to phosphate limitation, including the replacement of cellular membrane phospholipids with non-phosphorous lipids. Under phosphate starvation, phospholipids in extraplastidial membranes are replaced by betaine lipids in microalgae. In higher plants, the synthesis of betaine lipid is lost, driving plants to other strategies to cope with phosphate starvation where they replace their phospholipids by glycolipids. The aim of this work was to evaluate to what extent betaine lipids and PC lipids share physicochemical properties and could substitute to each other. Using neutron diffraction and molecular dynamics simulations of two synthetic lipids, the

dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and the dipalmitoyl- diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine (DP-DGTS), we found that DP-DGTS bilayers are thicker by 6 Å than DPPC bilayers and therefore are more rigid. Furthermore, DP-DGTS bilayers are more repulsive, especially at long range, maybe due to unexpected unscreened electrostatic contribution. Finally, at defined hydrations, DP-DGTS bilayers coexist in gel and fluid phase. This may be indicative of a low inter-phase line tension, which may be a consequence of the low thickness mismatch between fluid and crystalline chains, bilayers in the fluid phase being almost as thick as in the gel phase. This difference of sensitivity to hydration between PC and DGTS could be an explanation for the diversity of betaine lipids observed in marine organisms versus their disappearance in seed plants.

Keywords:

Betaine lipid, neutron membrane diffraction, molecular dynamics, phosphate starvation, algae, evolution

1. Introduction

Many organisms, such as bacteria, plants, and fungi, rely on mineral nutrients taken up directly from the soil or aquatic environment, and therefore tend to have exquisitely specialized mechanisms to cope with limitation of a given essential nutrient. For example, most organisms have well-defined responses to phosphate limitation, including the replacement of cellular membrane phospholipids with non-phosphorous lipids. The latter point has been well documented in the plants *Arabidopsis* (Jouhet et al, 2004) and oat (Andersson et al, 2005), where glycolipids replace phospholipids in the membranes. In bacteria such as the α -proteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*, in fungi *Flammulina velutipes*, in microalgae such as *Phaeodactylum tricornerutum* and *Nannochloropsis oceanica*, under phosphate stress, cells become depleted of membrane phospholipids and induce the synthesis of non-phosphorous lipids, such as glycolipid species but also betaine lipids (Abida et al, 2015; Muhlroth et al, 2017; Riekhof et al, 2005a; Senik et al, 2015).

Betaine lipids can represent up to 40% of the membrane lipid content (Dembitsky, 1996). The betaine lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine (DGTS), which was first discovered in the unicellular alga *Ochromonas danica* (Brown & Elovson, 1974) and later on in *Chlamydomonas reinhardtii* (Janero & Barnett, 1982) and other lower plants and fungi (Dembitsky, 1996; Kunzler & Eichenberger, 1997), has been proposed to replace phosphatidylcholine (PC). Presently, three basic types of betaine lipids of significant quantitative occurrence among polar lipid classes are known in photosynthetic organisms; namely, DGTS, DGTA (diacylglycerohydroxymethyl-N,N,N-trimethyl-b-alanine), and DGCC (diacylglycerylcarboxy-N-hydroxymethylcholine) (Dembitsky, 1996; Kato et al, 1996; Sato, 1992).

The complementary association between betaine lipids and phospholipids has long been accepted as an adaptive strategy to cope with periodic phosphate deficiency in the natural environment. However, the degree of change in cellular betaine lipids and PC contents upon fluctuations in external

phosphate (Pi) availability is quite different among species (Canavate et al, 2017b). These species-dependent differences imply metabolic diversity among algae, as well as versatility in betaine lipids function and requirement under Pi-starved conditions, yet we lack a comprehensive understanding of betaine lipids functions (Canavate et al, 2016). Despite this need for extending research on betaine lipids from microalgae, only a few contributions followed the initial works compiled by (Dembitsky, 1996). The presence and the description of betaine lipids in cells are only based on biochemical analyses and therefore poorly cover the wide range of organisms (Canavate et al, 2016; Dembitsky, 1996; Kunzler & Eichenberger, 1997; Makewicz et al, 1997; Vaskovsky et al, 1998). In a simplified view, betaine lipids are present in lower plants, algae and some fungi but even these groups show several exceptions and they are absent from seed plants, i.e. gymnosperm and angiosperm (Rozentsvet, 2004). All these studies were accomplished before the amendment of the classification and the use of genetic tools to improve the phylogeny. Because the biosynthetic pathway to DGTS is now known, new phylogenetic inference on the appearance and disappearance of DGTS biosynthesis enzymes could be achieved.

Biosynthesis of DGTS was first discovered in bacteria and is realized in two steps by the two enzymes BtaA and BtaB, whereas in *Chlamydomonas* and in fungi it is catalyzed by one bifunctional enzyme Bta1 containing the two domains BtaA and BtaB. BtaA uses diacylglycerol and S-adenosylmethionine (SAM) as substrates to produce diacylglycerol-O-homoserine that will then be used by BtaB to produce DGTS by adding successively three methyl groups on the nitrogen from the SAM donor (Riekhof et al, 2005a; Riekhof et al, 2005b). DGTA is assumed to be synthesized by decarboxylation/re-carboxylation of DGTS (Sato, 1991), but the enzyme and the mechanisms are still unknown and nothing is known so far about DGCC synthesis. The wide range of biochemical work done on algae combined to the reconstruction of phylogenetic relationships could help to decipher the evolution of the lipid metabolism from algae to higher plants, how they adapt their strategy to nutrient starvation and why betaine lipid synthesis pathways disappear through evolution.

In algae, under phosphate starvation, a situation commonly met in the environment, betaine lipids replace phospholipids in extraplastidic membranes. Because betaine lipids are localized in extraplastidic membranes in algae (Eichenberger, 1993; Kunzler et al, 1997), and share a common structural fragment with the main extraplastidic phospholipid PC (*Figure 1*), it can be speculated that these two lipid classes are interchangeable within the membrane structure, but this was never demonstrated. However, looking throughout a wide range of organisms, no general correlation could be found between the amounts of DGTS and PC (Kunzler & Eichenberger, 1997). It is therefore of great importance to understand the ability of betaine lipids to substitute PC lipids from a physicochemical perspective, and to determine if they can fulfil the same biological roles.

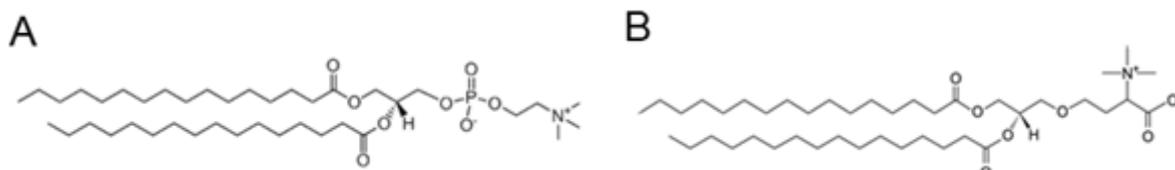


Figure 1. Lipid chemical structures. (A) Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). (B) Dipalmitoylglycerol-N,N,N-trimethyl-homoserine (DP-DGTS)

The only study on the physicochemical properties of betaine lipids was carried out by (Sato & Murata, 1991). They showed that the gel-to-fluid phase transition temperature of DGTS bilayers is only slightly higher than that of PC lipids with the same acyl chains, suggesting similarities in the headgroups' mutual interactions. To which extent betaine lipids are suited to substitute PC lipids also depends on many other factors like the structural aspects of lipid packing and their influence on membrane fluidity, bending rigidity, and on membrane-membrane interactions.

To unravel the functions of betaine lipids as well as their ability to act as phosphorous-free PC lipid substitutes, we investigated their physicochemical properties by neutron diffraction and computer simulations. Our results indicate that DGTS bilayers are much thicker and more rigid than PC lipid bilayers and that the gel/fluid phase transition is much broader for DGTS bilayers than for PC lipid bilayers. Furthermore, DGTS bilayers are more repulsive, especially at long range than PC bilayers. Altogether, these results show that coexistence of PC lipid and DGTS in the same membrane might be a disadvantage for organisms living in freshwater environment. Furthermore, the evolution of the DGTS synthase gene diverges between freshwater and marine organisms, indicating the evolution pressure differs between these habitats and might give a hint for the disappearance of DGTS in seed plants.

2. Materials and methods

2.1. Lipid material

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0/16:0 PC) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine (16:0/16:0 DGTS) were purchased at Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

2.2. Differential Scanning Calorimetry

Differential scanning calorimetry (DSC) experiments were performed using a Micro DSC III differential scanning calorimeter (Setaram, France). The aluminum capsules containing the samples were filled with 500 μ L of 0.1% and 0.2% (w/v) solutions of DPPC and DP-DGTS respectively. The lipid solutions were extruded with a thermostated extrusion kit from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) by passing the suspensions 11 times through 0.1 μ m pore diameter polycarbonate membranes. The two samples were heated and cooled between -4 $^{\circ}$ C and 55 $^{\circ}$ C, with a heating rate of 0.5 $^{\circ}$ C/min. Only the last three of four cycles were identical and used in the data

analysis, the first one being always different from the following cycles due to the annealing of the vesicles after the extrusion step. The phase transition temperature was defined at the maximum of the endo- and exothermic peaks.

2.3. Neutron diffraction experiments

2.3.1. Sample preparation

For the membrane diffraction experiments, samples consisted of oriented lipid multilayer films (500 μg to 1 mg of dry material) spread from 500 μL chloroform/methanol (1/2: v/v) on silicon wafers (3 inches diameter, 275 μm thick) from Si-Mat (Kaufering, Germany). Each wafer was cut to produce a rectangular shape of 20 mm (width) x 75 mm (height). After lipid deposition, the solvent mixture was evaporated at room temperature and pressure until a solid film was obtained, and then dried 30 min under vacuum. The samples were then annealed at 50 $^{\circ}\text{C}$ in saturated D_2O vapor overnight, before transfer into a humidity chamber where the sample was equilibrated before the diffraction experiments.

For the SANS experiment, aqueous solutions of DPPC and DGTS were prepared in pure D_2O at 10% (w/v) and 3% (w/v), respectively, and then vortexed before transfer into 1 mm path length quartz cells (Hellma, Germany) for the data acquisition. For DPPC, this is well above the swelling limit commonly observed at 40% water for phosphatidylcholines.

2.3.2. Relative humidity control

Relative humidity (RH) scans at fixed sample temperature were performed using the high precision BerILL humidity chambers developed at ILL and described elsewhere (Gonthier et al, 2019). The samples were mounted vertically on a manual 4-axis goniometer head (Huber, Germany) embedded in the humidity chamber and pre-aligned using a laser-based optical setup.

For both lipids, the temperature in the chamber was maintained at 50 $^{\circ}\text{C}$ during the measurements and the humidity was varied by changing the temperature of the water reservoir generating the water vapor. For each sample, the relative humidity was increased and monitored *in-situ* step by step after each data collection at the previous RH condition, without opening the chamber at any time during the isothermal humidity scans.

After annealing offline at 100% RH, each sample was re-incubated in the humidity chamber prior to data collection. Since three identical chambers are available on the D16 instrument, two sample can be equilibrated while a third sample is being measured. To reach 100% RH at the end of the humidity ramping, the chamber was taken out of the instrument and maintained overnight for further equilibrium at 100%. The resulting range of humidities investigated was 30% to 100% RH.

Typical equilibrium times were ranging from 1 h at low humidity up to 3 h at high humidity. During this *in-situ* equilibration phase, the position and intensity of the most intense Bragg reflections was monitored to ensure that for every condition (T, RH, and water contrast) the sample was at equilibrium (constant *d*-spacing and constant intensity of Bragg reflections *versus* time).

Two neutron scattering length density (NSLD) contrasts between water and the lipid bilayers were used using different H₂O/D₂O ratios, namely 0:100 and 92:8 (v/v). Using protonated lipids, the pure D₂O contrast yields high intensities and low incoherent background, while the 8% D₂O contrast (zero NSLD of water) highlights lipid headgroups. This second contrast provides NSLD profiles from which the bilayer thickness can be directly extracted (Salvador-Castell et al., 2020).

2.3.3. Scattering methods

Both neutron diffraction and SANS data were collected at the D16 cold neutron diffractometer of the Institut Laue-Langevin (ILL, Grenoble, France).

D16 uses a monochromator made of nine highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) crystals whose orientation can be set to focus the beam vertically in a continuous manner from unfocussed to detector or sample focusing. For membrane diffraction experiments the crystals are oriented in sample focusing geometry combined to vertical slit collimation to maximize the incident neutron flux at the sample (3×10^7 N.cm⁻².s⁻¹). The wavelength of the neutron beam was $\lambda = 4.47$ Å.

Figure S1 shows the geometry of the experiment in top-view. The incident beam illuminates the sample plane with an adjustable angle of incidence Ω and is scattered into various directions at angles 2θ with respect to the incident beam. For each Ω , the 2θ -dependent intensity is recorded with a position-sensitive ³He detector (MILAND) set to a distance of 950 mm to the sample. This 2D detector is made of 320 X by 320 Y arrays spaced by a distance of 1 mm providing a pixel resolution of 1 mm x 1 mm and a detection area of 320 x 320 mm². By rotating the sample stage, and thus by stepwise variation of Ω , 2-dimensional maps of the intensity as a function of 2θ and Ω are recorded, as described previously (Schneck et al, 2011; Schneck et al, 2008). These so-called “rocking curves” (Ω -scans) were collected by steps of 0.05 deg. in a Ω -range of -1 to 15 deg. In this procedure, the intensity is normalized to the detector pixels’ sensitivity and solid angle, and to the illuminated sample area. The angles 2θ and Ω are associated with the reciprocal space coordinates q_z and $q_{||}$, i.e., the scattering vector components perpendicular and parallel to the sample plane, respectively, according to the geometrical relations (Figure S1):

$$q_z = (2\pi/\lambda)[\sin(2\theta - \Omega) + \sin(\Omega)] \quad (1)$$

and

$$q_{||} = (2\pi/\lambda)[\cos(2\theta - \Omega) - \cos(\Omega)] \quad (2)$$

Figure S1.C shows a typical reciprocal space map, i.e., a map of the intensity as a function of 2θ and Ω . It features the characteristic “Bragg sheets” of planar membrane multilayers (Salditt, 2005). While the scattering intensity along the specular line ($\theta = \Omega$, $q_{||} = 0$) contains information on the structure perpendicular to the surface (notably the lamellar periodicity as encoded in the Bragg peak positions and the scattering length density profile as encoded in the peak intensities), the diffuse scattering intensity ($\theta \neq \Omega$, $q_{||} \neq 0$) along the Bragg sheets additionally contains information on the in-plane structure, notably the membrane fluctuations in terms of their spatial self- and cross-correlation functions (Salditt, 2005; Schneck et al, 2011; Sinha et al, 1988).

For the SANS experiments the D16 instrument was set to pinhole geometry by collimating the beam both horizontally and vertically to produce a symmetrical angular resolution and beam size in the two directions. As

described above, the samples were bulk suspensions of multilamellar vesicles prepared in a large excess of pure D₂O. The sample temperature was changed using a water bath connected to the sample changer. In these conditions, the d -spacing measured from the Debye-Sherrer ring observed on the SANS patterns yields the d -spacing at maximum swelling of the lamellar period with excess water in equilibrium with the membrane stacks.

2.3.4. Data reduction

Sample rocking scans (Ω -scans) were analyzed using the ILL LAMP software (Richard et al, 1996). Prior to reduction to 1D, each detector frame resulting from an Ω step is normalized to a detector calibration that accounts for the detector pixels' efficiency and solid angle. Then, each Ω step is reduced to 1D by vertical integration of the intensity in a ROI ($2\theta_y$ vs $2\theta_x$ range) that corresponds to the location of Bragg peaks. Each Bragg peak position and intensity is fitted after summation of the intensity in an Ω range of 0.5 deg. (11 steps of 0.05 deg.) centered on the Bragg peak position. The peak shape of the fit to the data was Gaussian and a quadratic function was used for the background. Then, Bragg's law was used to determine the lamellar periodicity d according to:

$$2d\sin\theta_B = n\lambda \quad (3)$$

where θ_B is half the scattering angle $2\theta_B$ of the Bragg peak, n the order of the peak and λ the wavelength (4.47 Å). A linear fit to the plot $2\sin\theta_B$ vs. n , considering up to $n = 5$ orders, was used to obtain the d -spacing from the slope $s = \lambda/d$. The error on the d -spacing, δd , was given by propagating the error on the slope of the linear fit to the data.

2.3.5. Pressure determination

The osmotic pressure Π applied to the membrane stacks by controlling the relative humidity of the air in equilibrium with the sample, is calculated according to (Parsegian & Rand, 1995):

$$\Pi = - \frac{k_b \times T_{sample}}{v_w^0} \times \ln\left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (4)$$

where k_b is the Boltzmann constant ($k_b = 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T_{sample} , the sample temperature, v_w^0 the molecular volume of water (30 Å³) and P/P_0 the relative humidity RH.

2.3.6. Neutron scattering length density profiles

Neutron scattering length density profiles (NSLD) were calculated from the integrated intensities of Bragg peaks corrected for the neutron absorption (C_{abs}), and the Lorentz factor correction (C_{Lor}) according to (Harroun et al, 2008), resulting in the corrected discrete structure factor of order n :

$$|F_n|^2 = C_{abs} C_{Lor} I_n \quad (5)$$

where I_n is the intensity of the Bragg peak at the order n .

The corrections are given by:

$$C_{abs} = \frac{\alpha}{1 - e^{-\alpha}}, \quad \alpha = \frac{2\mu t}{\sin\theta} \quad (6)$$

$$C_{Lor} = \sin(2\theta) \quad (7)$$

where μ is the absorption coefficient (5 cm^{-1}), t is the sample thickness calculated from the deposited amount of dry lipid (0.5 mg) and the sample area (10 cm^2). It equals to $50 \text{ }\mu\text{m}$ before hydration, for a deposited amount of 0.5 mg.

The NSLD were constructed with the Fourier transform of the structure factor as follows (Worcester & Franks, 1976):

$$\rho(z) = \frac{2}{d} \sum v_n F_n \cos\left(\frac{2\pi n z}{d}\right) \quad (8)$$

where z is the direction perpendicular to the bilayer planes and v_n corresponds to the phase of the structure factor of order n . According to the literature, at the 8% D_2O contrast, we tested different hypotheses for the discrete structure factor signs to obtain a centrosymmetric SLD profile with a minimum at $z = 0$, the bilayer mid-plane, where hydrogen rich methyl groups are located and yield the lowest SLD, and the highest SLD for the polar head regions. The assigned phases that give the best agreement with these constraints were -, -, +, - in agreement with (Pan et al, 2012) and our molecular dynamic analysis.

We consider here as a definition of the bilayer thickness (d_b) the center-to-center distance between lipid polar heads as obtained from a fit to the two headgroup layer positions in the NSLD profile (as illustrated in *Figure S7*). The error associated to d_b is given by the standard deviation between the fit and the calculated NSLD. Finally, the water layer thickness (d_w) is calculated from the known d -spacing and the bilayer thickness according to:

$$d_w = d - d_b \quad (9)$$

and the error is defined as $\delta d_w = \sqrt{\delta^2 d + \delta^2 d_b}$.

2.3.7. Bragg sheet analysis

According to the *Discrete Smectic Hamiltonian* description of interacting multilayers (Lei et al, 1995), the membrane fluctuation self and cross correlations that give rise to characteristic off-specular scattering are governed by the mechanical properties of the interacting membranes in terms of the membrane bending modulus κ and the inter-membrane compression modulus B . As we have shown earlier, the experimentally obtained reciprocal space maps within this framework can be satisfactorily modeled solely based on the underlying mechanical parameters κ and B , and on an empirical cut-off parameter termed R (Schneck et al, 2011). In practice, this procedure relies on the *kinematic approximation* (KA) of wave scattering, because application of the more accurate *distorted-wave Born approximation* (Sinha et al, 1988) would require detailed additional knowledge of the sample structure, which is unavailable. As a consequence, our KA-based treatment, which is only valid wherever the intensity is weak compared to the incident beam, does not correctly capture the specular maximum of the first Bragg sheet, where this condition is typically violated. In the past, we therefore ignored the first Bragg sheet and relied on the second one (Schneck et al, 2011; Schneck et al, 2008). In line with our more recent work (Latza et al, 2020a), we combine here information from the first two Bragg sheets (*Figure S7*): while the Caillé parameter

$$\eta = \pi k_B T / \left(2d^2 \sqrt{\kappa B / d}\right) \quad (10)$$

is obtained from the specular/diffuse scattering intensity ratio in the second Bragg sheet, the de Gennes parameter

$$\Lambda = \sqrt{\kappa/(Bd)} \quad (11)$$

is obtained from the decay of the off-specular intensity in the first Bragg sheet along $q_{//}$, excluding the specular intensity which violates the KA. The best-matching values of η , Λ , and R are then determined by their systematic variation in the model until the best agreement with the experimental data is achieved. Finally, the mechanical parameters are obtained by solving Eqs.10 and 11 for κ and B .

2.4. SAXS experiment

DPPC (2.5 mg) and DP-DGTS (2.5 mg) lipid powders were dissolved in ≈ 1 mL of CHCl_3 . The solvent was evaporated under N_2 flow by rotating the glass vial to form a dried lipid film. The samples were placed in the vacuum oven under 50°C for 2 h to remove residuals of CHCl_3 . The film was re-hydrated by adding ≈ 96 μL of pure water to achieve a final concentration of ≈ 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The vials with solutions were shaken multiple times during the 15 min rehydration period. A borosilicate capillary of a diameter 1.5 mm was filled with ≈ 50 μL of sample solution and hermetically sealed.

SAXS measurements were performed on the D08 Advanced diffractometer equipped with a VÅNTEC-1 position-sensitive detector and an X-ray source producing a monochromatic Cu $K\alpha$ beam with $\lambda = 0.154$ nm. The data were collected by running a rocking scan with fixed detector position covering a 2θ -range up to 7 deg. The incident beam was collimated by a combination of a Göbel mirror and a pair of parallel slits (0.1 mm) followed by a Soller collimator optics to limit axial divergence of the beam. A pinhole of 1 mm in diameter was placed in the immediate vicinity to the sample. A knife-edge adjusted to cut the part of the direct beam off was placed in front of the detector. The capillary was placed in a sample holder, which is fixed at the center of a goniometer. A water background, measured separately with the same instrument configuration, was subtracted prior to further analysis. The 2θ -values were converted to q according to the relation:

$$q = 4\pi/\lambda \times \sin(2\theta/2) \quad (12)$$

The data were fitted with Gaussian functions to obtain the Bragg peak positions q_B , from which the d -spacing was deduced according to Bragg's law:

$$d = 2\pi n/q_B \quad (13)$$

where the integer n is again the diffraction order.

2.5. Set up of the computer model

The computer model of the hydrated bilayers employs atomistic representations of lipid and water molecules (for simulation snapshots, see *Figure S2*). Following our previous work (Kowalik et al, 2017), we use the assisted freezing method (Schubert et al, 2011) for the construction of fully hydrated membranes in the L_β (gel) phase at an initial temperature of $T = 270$ K. Initially, 16 lipid molecules in each leaflet are arranged on a hexagonal lattice with random orientation but avoiding strong overlap of the atomic positions. 960 water molecules are inserted randomly in a 3 nm slab, corresponding to $n_w = 30$ waters per lipid. The system is then carefully relaxed during a 1 ns molecular dynamics simulation forcing the dihedral angles of the lipid tails in gauche transformation

as described elsewhere (Schubert et al, 2011). To enforce a L_β configuration as shown in Figure S2.A, one of the hydrated leaflets including the hydrating waters is then selected and rotated by 180° around the z-axis, after which the system is replicated in the x-y plane resulting in a total of 128 lipid and 3840 water molecules. In all simulations, periodic boundary conditions are employed using triclinic unit cells with a lattice angle $\gamma = 60^\circ$ and the initial area per lipid is fixed to 0.58 nm^2 . This system is then relaxed for 100 ns at 270 K and finally heated up to 300 K using a heating rate of 0.1 K/ns which is sufficiently low to avoid spontaneous melting of the computational model (Kowalik et al, 2015). During the relaxation semi-isotropic pressure coupling is employed using the Berendsen barostat (Berendsen et al, 1984) which in the heating step is replaced by anisotropic coupling to allow for full relaxation of the lattice modes.

To construct the corresponding bilayers in the L_α (fluid) phase, the system is constructed equivalently, but instead of anisotropic pressure coupling a semi-isotropic coupling scheme is employed in the last step at a temperature of 330 K. All scripts employed to set up these systems as well as equilibrated structures and simulation input files are available in <https://doi.org/10.18419/darus-2360>.

For DPPC, we use the well-established united-atom Berger force-field (Berger et al, 1997) - which essentially is based on the Optimized Potentials for Liquid Simulations (OPLS) force field with refined parameters for the hydrocarbon tail interactions (Jorgensen & Tirado-Rives, 1988) - and the simple point charge/extended (SPC/E) water model (Berendsen et al, 1987). Although this force field is known to be problematic when comparing structural properties from NMR experiments, it perfectly reproduces experimental pressure-distance data (*Figure 8*, *Figure S10*) (Kowalik et al, 2017; Schneck et al, 2012) and the chain melting thermodynamics (Kowalik et al, 2015). Furthermore, comparison with simulations results that use different force fields for lipids and water have shown that the hydration thermodynamics are robust with respect to force field variations (Kowalik et al, 2017; Wolde-Kidan et al, 2019). Contrary to the original parametrization (Berger et al, 1997) electrostatic interactions are calculated by the Particle-Mesh-Ewald (PME) method (Darden et al, 1993; Essmann et al, 1995) using a relative accuracy of 10^{-5} and we checked in Figure S3 systematically the influence of the cutoff for Lennard-Jones interactions. We found that $r_c = 1.4 \text{ nm}$ yields lipid molecular areas and water densities consistent both with the LJ-PME method (Wennberg et al, 2013) corresponding to an infinite cutoff and also in agreement with experimental data.

An atomistic representation of DP-DGTS is obtained by adapting the Berger DPPC atomistic topology with refined OPLS parameters for the carboxyl group (Maciejewski et al, 2014). In detail, the nitrogen group and the lipid tails are identical and the additional methylene groups are taken from the OPLS force field which results in total charge neutrality on the betaine headgroup. All headgroup bonded parameters stem from OPLS. An initial structure of a DP-DGTS molecule was created using the geometry optimization of the Avogadro simulation package (Hanwell et al, 2012). All the simulation input files available at <https://doi.org/10.18419/darus-2360>.

2.6. Computer simulations

All atomistic Molecular Dynamic (MD) simulations are performed using versions 2020 and 2021 of the GROMACS simulation package (Abraham et al, 2015). All simulations are performed with an integration time step of 1 fs in the canonical constant pressure ensemble as described above. Temperature was maintained at $T =$

300 K for the gel phase and $T = 330$ K for the fluid phase using the canonical velocity rescaling thermostat (Bussi et al, 2007) with a characteristic time of 0.5 ps. The time constant for the pressure coupling is set to 1 ps. Lennard-Jones interactions are truncated and shifted to zero at $r_c = 1.4$ nm. Water molecules are kept rigid using the SETTLE algorithm (Miyamoto & Kollman, 1992). Analysis of the simulations is performed using our freely available MAICoS package (<https://maicos-devel.gitlab.io/maicos/>) and chemical potentials are evaluated using the Multistate Bennet Acceptance Ratio method (MBAR) (Shirts & Chodera, 2008) and the toolchain of the Alchemy project (<https://alchemy.org/>).

In the computer simulations, the dehydrating (osmotic) pressure from Eq.4 is evaluated using the Gibbs-Duhem relation:

$$\Pi = -\frac{\mu - \mu_0}{v_w^0} \quad (14)$$

where μ_0 and v_w^0 denote the chemical potential and the partial molecular volume, respectively, of pure water in bulk and μ is the chemical potential of water between the bilayers at a given hydration level (Schneck et al, 2012). Eq.14 indicates that the chemical potential of water in atomistic MD simulations needs to be evaluated with a precision as high as $\delta\mu \sim 0.01 k_B T$. We independently measure the excess and ideal contributions, μ^{ex} and $\mu^{id} = k_B T \ln(\rho_w \Lambda^3 / m_w)$, where ρ_w is the water density, Λ its thermal wave length, N_A the Avogadro number and m_w the water molecular mass. μ^{ex} is evaluated using a Free Energy Perturbation ansatz where a test particle is brought from vacuum to the water using 38 discrete λ states for the MBAR analysis, where first the Lennard Jones interactions are turned on using a soft-core potential approach and then the electrostatic interactions are added. While by definition μ is constant over the simulation volume in thermal equilibrium, its contributions μ^{ex} and μ^{id} are not due to the inhomogeneous water distribution perpendicular and depend on the coordinate perpendicular to the membrane surface. We thus choose to measure the chemical potential at the center of the water slab between the bilayers and fix the test particle in the plane parallel to the membrane surface using a harmonic potential acting on its center of mass. To overcome potential sampling issues due to the slow dynamics of lipids in the gel phase five independent systems are constructed as described above at $n_w = 30$ waters per lipid and then step-wise dehydrated by a 100 ns equilibration run. The five equilibrated systems at each n_w are then sampled at each λ state for 100 ns, corresponding to $5 \times 38 \times 100$ ns = 19 μ s sampling time per data point shown in Figure 8 and Figure S10. For simulations in the fluid phase one system is melted at $T = 330$ K and dehydrated equivalently, where for consistency each λ state is sampled for 500 ns and analyzed in blocks of 100 ns.

NSLD profiles can be obtained readily from the simulation data by multiplying the united atom density probability with the corresponding scattering length densities, which we took from NIST (<https://www.ncnr.nist.gov/resources/activation/>). However, this approach corresponds to taking infinitely many terms into account in Eq.8, which in the experimental analysis is impossible since only few Bragg peaks are present. We thus first calculate the corresponding structure factors $|F_n|^2$ via discrete cosine transform and limit to four terms in the reciprocal space, which is the typical number of Bragg peaks present in the experimental analysis. After back transform this yields NSLD profiles from which the bilayer thickness d_b is evaluated. Note that the phases ν_n obtained from the simulations agree well with the experimental analysis.

2.7. Phylogeny

The *Microchloropsis gaditana* locus Naga_100016g36 (annotated as Protein of unknown function DUF3419) was identified as putative betaine lipid synthase by homology with *Nannochloropsis oceanica* BTA1 (Murakami et al, 2018). The Naga_100016g36 CDS was translated and the amino acid sequence used as a query for a series of BLAST searches in all the publicly available databases. Both tBLASTn and PSI-BLAST (Altschul et al, 1997; Altschul et al, 2005) were performed together with a human-curated process in order to obtain the widest dataset possible and the most robust one. The same was done with all the sequences used by (Murakami et al, 2018). The final dataset contained amino acid sequences from at least 14 families of eukaryotes, bacteria and archaea. Because in most eukaryotes the two domains of the BTA protein (the 3-amino-3-carboxypropyl-transferase and the S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase (SAM) domains) are arranged in two different configurations, two separate alignments were produced. The amino acid sequences of the two domains were compiled in two separate fasta files and aligned using MUSCLE (Edgar, 2004) then curated using BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy) software (Criscuolo & Gribaldo, 2010) to select the phylogenetic informative regions. For each alignment the substitution model that best fit the data was selected by running the 'Find Best DNA/Protein Model' utility implemented in MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analyses) software (Kumar et al, 2018). The Le-Gascuel substitution model for Maximum Likelihood (ML) phylogenetic inference method was chosen as the best fitting for both datasets (Le & Gascuel, 2008). Non-uniformity of evolutionary rates among sites was modelled using a discrete Gamma distribution (+G). For the SAM domain alignment, a certain fraction of sites was considered to be evolutionarily invariable (+I). The ML phylogenetic analyses were supported by 5000 (bootstrap) pseudoreplicates. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor Joining (NJ) and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. All positions with less than 95% site coverage were eliminated. Trees were drawn to scale with the branch length measured in the number of substitutions per site.

In order to infer both the fusion history and the habitat of the organisms possessing a BTA gene, a Bayesian inference was carried out using MrBayes v3.2.7 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003; Ronquist et al, 2012b) using a partitioned model (Ronquist et al, 2012a). After some trial runs, the conditions for the Bayesian analysis were set up to ensure that the Average standard deviation of split frequencies reached stationarity over the course of the sampling. For each analysis, a total of 1,600,000 generations was implemented, with successive samples separated by 100 generations after an initial "burn in" period of 25% of the number of samples. The Bayesian posterior probabilities (BPP) were estimated by a two independents run of four Metropolis Coupled chains (MCMCMC). For each dataset, the model selection was done during the analysis by estimating the posterior probabilities of the different models together with their parameters.

3. Results

3.1. Phase transition of DP-DGTS and DPPC bilayer

To compare DGTS and PC physicochemical properties, we chose to work on lipids with the same diacylglycerol backbone in order to have variation only within the polar head. Because DPPC has been widely studied and DP-DGTS is commercially available, all the following work was achieved on these two molecules with saturated C16 tails. However, in biological membranes, natural lipids are unsaturated and therefore usually in fluid phase at room temperature. To determine the chain melting temperature for DPPC and DP-DGTS, differential scanning calorimetry (DSC) thermograms were collected from unilamellar vesicles extruded on 100 nm pores (*Figure 2*).

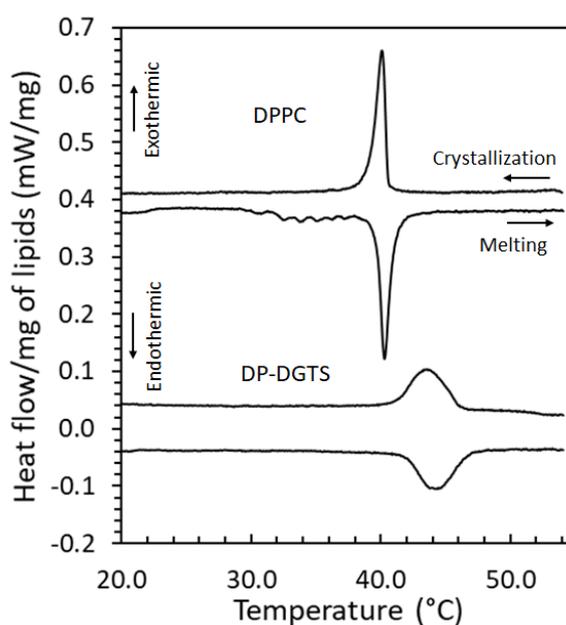


Figure 2. Differential Scanning Calorimetry (DSC) thermograms of DPPC and DP-DGTS unilamellar vesicles. DPPC curves were offset for clarity.

The DSC data show a sharp phase transition at 40.2 ± 0.1 °C for DPPC that is coherent with what was found in the literature for DPPC large unilamellar vesicles (Drazenovic et al, 2015). For DP-DGTS, the phase transition is much broader and occurs within a range of 4 °C around 43.8 °C. This unusually broad phase transition indicates either weak cooperativity between lipid bilayers or that phase coexistence is not a thermodynamic disadvantage. It confirms previous results found by (Sato & Murata, 1991) showing that the gel-to-fluid phase transition temperature of DGTS bilayers is only slightly higher than that of PC lipids with the same acyl chains. Therefore, to favor fluid phase state, all following experiments were carried at 50 °C, at least 5 °C above the phase transition in pure water.

3.2. Lamellar organization of DP-DGTS and DPPC bilayers

To compare the organization and the membrane interactions of PC and DGTS, we reconstituted multilayer stacks of membranes from pure DPPC or DP-DGTS at the surface of silicon wafers, and we analyzed the molecular organization and periodicity as a function of the hydration as set by controlling the relative humidity in the chamber. Indeed, the lipid bilayer properties (phase, bilayer thickness, interaction with the water) will have an impact on membrane protein interaction and function and therefore on cell physiology (Dowhan, 1997).

By neutron diffraction experiments, measurements of the repeat distance (d -spacing) and of the water layer thickness as a function of the relative humidity (RH) or, more generally, of the water chemical potential, allow us to reconstruct the membrane interaction profile, the so-called pressure-distance curve (Kanduč et al, 2017; Nagle & Tristram-Nagle, 2000). To control the RH, the wafers were placed in a humidity chamber in which the RH was tightly adjusted with 8% D₂O or 100% D₂O vapor (*Figure 3* and *Figure S4* respectively). Because hydrogen and deuterium have different neutron scattering lengths and because the studied lipids are hydrogenated, D₂O enhances the contrast between the lipids and the water layers and therefore the diffracted intensity (Jacrot, 1976).

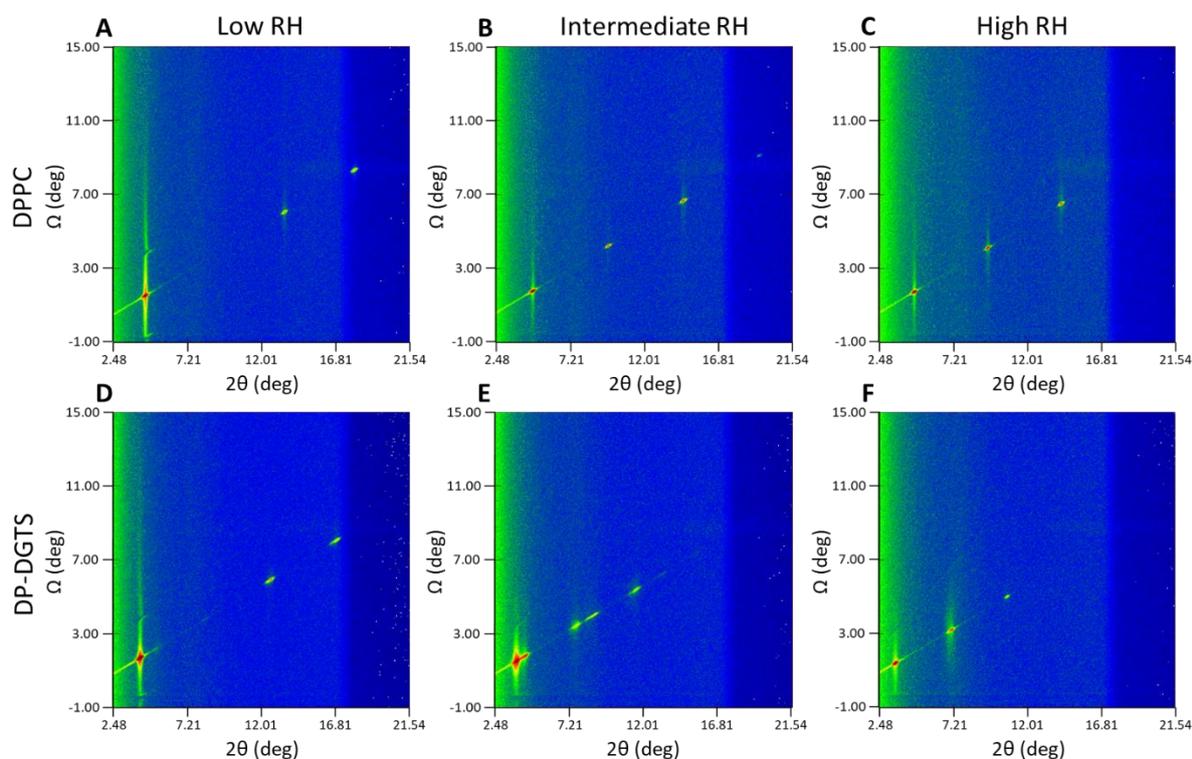


Figure 3. Diffraction scan $I(2\theta, \Omega)$ showing the Bragg peak positions of DPPC (A-C) and DP-DGTS (D-F) at three different humidities: low (A and D) intermediate (B and E) and high (C and F). The measurement were done at 50 °C. Relative humidity values: DPPC 30.3, 85.0, 95.8%. DP-DGTS 32.2, 87.2, 97.9%. Solvent composition 8% D₂O.

As observed on the diffraction neutron pattern (*Figure 3*), the two lipids are organized in lamellar phase at all humidities. The diffraction pattern contains three or four orders of diffraction indicating that the lattice disorder of the sample is small (Wiener & White, 1991). In the studied range of relative humidities, the gel-fluid phase coexistence could be observed with the presence of two Bragg peak sets (*Figure 3.E*, and *Figure S4.E* and *S5*). By following the repeat distance as a function of the hydration pressure (*Figure 4*), we could follow the two Bragg peak sets, one at a wider angle always present at low humidity and one at a smaller angle present at higher humidity. At 50 °C, DPPC is in gel phase at low humidity and in fluid phase at higher humidity (Matsuki et al, 2013). Therefore, when the two phases are observed, we conclude that the gel phase corresponds to the Bragg peaks at the wider angles whereas the Bragg peaks at the smaller angles corresponds to the fluid phase (*Figure S4* and *S5*).

The lamellar period d of DPPC and DP-DGTS was measured at 100% D₂O solvent contrast and at 8% D₂O solvent contrast over a humidity range from 30% up to 99.7% (*Figure 4*). The results show that the two experiments are reproducible and that the concentration of D₂O does not affect the lamellar period. By following the repeat distance as a function of the hydration, we observed that DPPC molecules are in gel phase at low humidity, are in coexistence of both fluid and gel phase through a narrow window of relative humidity and then are in fluid phase at high humidity as previously reported (Braganza & Worcester, 1986). On the opposite, in DP-DGTS bilayers, a phase coexistence can be observed over a wide humidity range before forming a single fluid phase at high humidity (*Figure 4*). This result is consistent with the broader peak observed by DSC on DP-DGTS vesicles. Using these two independent techniques, DSC and neutron diffraction, it appears that the phase transition for DP-DGTS is broad, favoring phase co-existence while this phenomenon is not observed for DPPC bilayers.

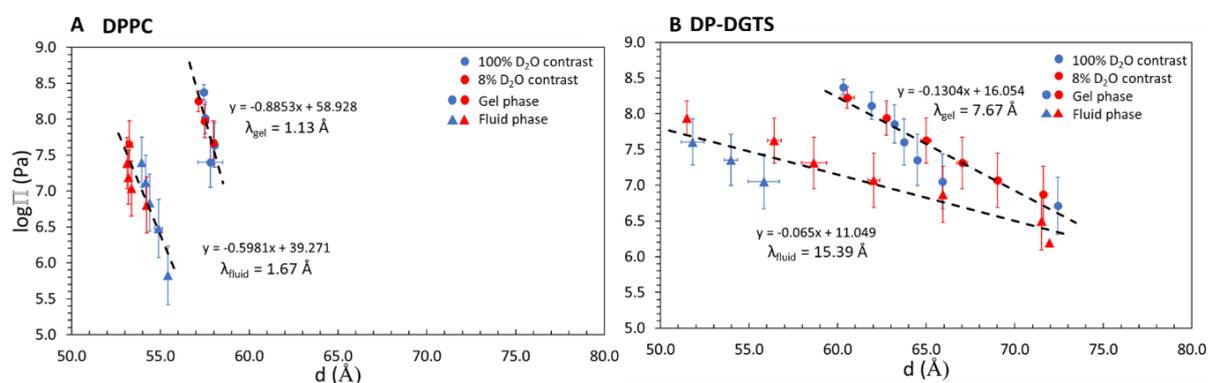


Figure 4. Lamellar period of DPPC (A) and DP-DGTS (B) bilayer stacks as a function of the humidity, measured at 50 °C. The period was determined at 100% D₂O contrast (blue), and at 8% D₂O contrast (red). The coexistence between gel and fluid phase is shown with the circles and the triangles respectively.

3.3. Hydration forces between DP-DGTS and DPPC bilayers

As stated before, the water uptake of membrane multilayers is commonly described in terms of pressure-distance curves, that is, plots of the dehydrating pressure Π (Eq.4) versus the lamellar spacing d . This representation contains information on the short-range interaction between the bilayers, usually called “hydration forces” (Kowalik et al, 2017). Π is identical to the interaction pressure and is found to exhibit an approximately exponential decay with increasing d (Figure 4). We made an exponential fit $\pi = \pi_0 e^{-d/\lambda}$ to the data points from Figure 4, where λ_d represents the characteristic decay length which reflects the hydration force and membrane compression effects (Kowalik et al, 2017). For DPPC, we found $\lambda_d^{(\text{gel})} = 1.1 \text{ \AA}$ and $\lambda_d^{(\text{fluid})} = 1.7 \text{ \AA}$, comparable with (Kowalik et al, 2017), who reported $\lambda_d^{(\text{gel})} = 1.0 \text{ \AA}$ and $\lambda_d^{(\text{fluid})} = 2.0 \text{ \AA}$. For DP-DGTS, the decay lengths are significantly larger, with $\lambda_d^{(\text{gel})} = 7.7 \text{ \AA}$ and $\lambda_d^{(\text{fluid})} = 15.4 \text{ \AA}$.

However, only the decay length λ_w of the pressure vs. the water layer thickness d_w corresponds to the hydration force per se, which thus requires careful definition of d_w . Actually, the membrane thickness d_b itself responds to hydration (Kowalik et al, 2017). Using membrane diffraction data, the lipid membrane thickness d_b is derived from the neutron scattering length density (NSLD) profiles and d_w is then calculated according to $d_w = d - d_b$. At 8% D₂O contrast, the maxima in the NSLD profiles correspond to high-NSLD region of the bilayers at the center of the headgroup layer as described in (Nagle & Tristram-Nagle, 2000). Therefore, we define the headgroup center-to-center distance as the thickness of the bilayer hydrophobic region (d_b) and d_w to the thickness of the water layer between lipid bilayers (Figure S6).

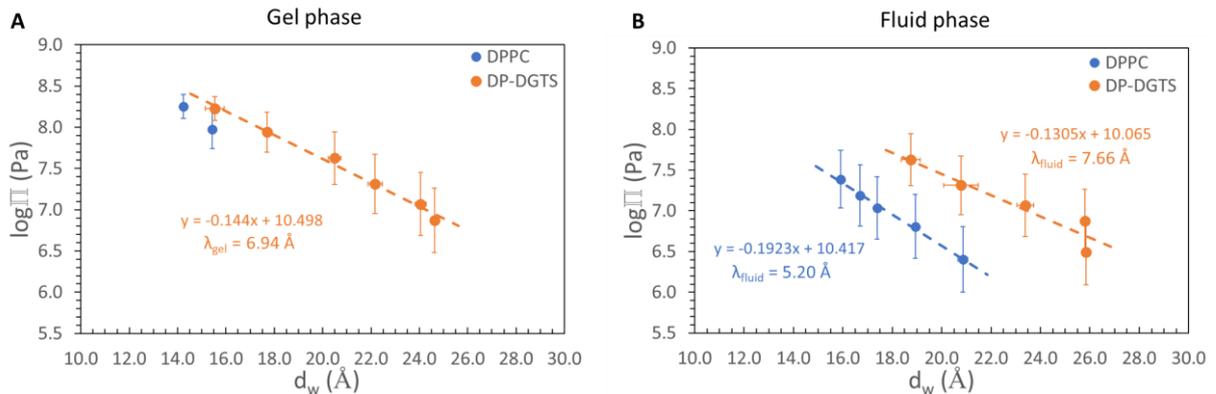


Figure 5. Water layer thickness d_w of DPPC (blue) and DP-DGTS (orange) as a function of the humidity, measured at 50 °C. The gel phase is shown on the graph **A**, and the fluid phase in the graph **B**.

Figure 5 shows the interaction pressure between DPPC and DP-DGTS membranes in gel and fluid phases, as a function of the water layer thickness d_w according to the above definition (Figure 5). For the gel phase of DPPC, we only have two data points at high pressures that prevent any accurate evaluation of the decay length. However, because the d and d_w values are in agreement with previous

studies, we can use the reported value for DPPC of $\lambda_w^{(\text{gel})} = 2.1 \text{ \AA}$ (Kowalik et al, 2017) for the comparison with DP-DGTS in gel phase. In fluid phase, we found for DPPC $\lambda_w^{(\text{fluid})} = 5.2 \text{ \AA}$, in acceptable agreement with the 3.8 \AA reported by (Kowalik et al, 2017). For DP-DGTS, because the range of coexistence between gel and fluid phase is quite large, we have enough data point to calculate the decay length and we found $\lambda_w^{(\text{gel})} = 6.9 \text{ \AA}$ and $\lambda_w^{(\text{fluid})} = 7.7 \text{ \AA}$.

In gel phase, the pressure decay length with respect to d_w is about 3 times higher for DP-DGTS bilayers than what is reported the literature for DPPC. Moreover, there is no significant difference of the decay length between gel phase and fluid phase in DP-DGTS bilayers, which is in contrast to DPPC. The observed differences between the short-range interactions of DPPC membranes and of DP-DGTS membranes suggest that the hydration repulsion between the surfaces of these two membranes types are significantly different, as was previously reported for the comparison between PC and glycolipids (Deme et al, 2014; Kanduč et al, 2017). On top of the hydration repulsion, the short-range repulsion may be strengthened due to the presence of charges. Namely, one cannot exclude that a small fraction of lipids deviates from the zwitterionic state, resulting in a tiny effective surface charge, which might be more pronounced for DP-DGTS because the pKa values of phosphates and carboxyl groups are not identical. Interestingly, for DP-DGTS the decay length with regard to d_w is smaller than the one with respect to d , which is the opposite trend reported for DPPC (Kowalik et al, 2017). As will be shown in the following section, this difference is related to the different response of the bilayer thickness to dehydration.

3.4. Bilayer properties of DP-DGTS and DPPC

Because bilayer thickness is important for correct membrane protein insertion, we extracted in *Figure 6* the bilayer thickness from the NSLD profile (*Figure S6*).

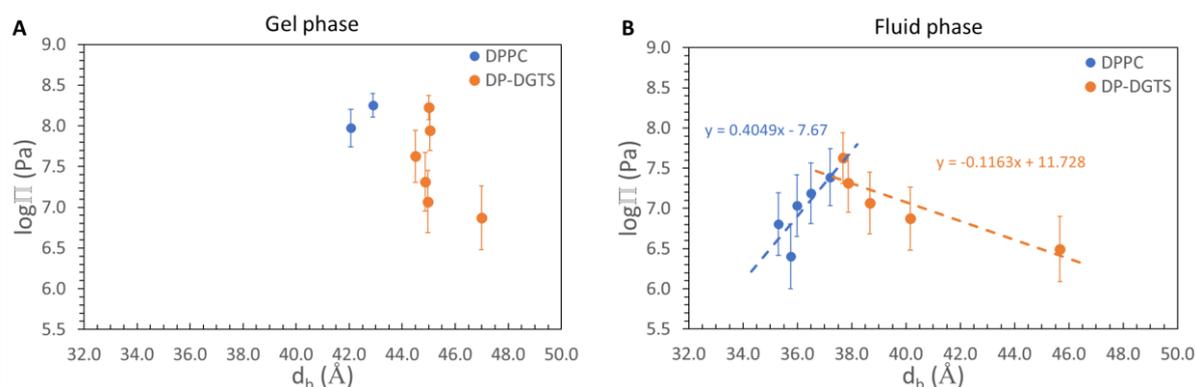


Figure 6. Bilayer thickness d_b of DPPC (blue) and DP-DGTS (orange) as a function of the humidity, measured at 50 °C. The gel phase is shown on the graph **A**, and the fluid phase in the graph **B**.

The bilayer thickness of DPPC obtained are $42.5 \pm 0.6 \text{ \AA}$ and $36.1 \pm 0.7 \text{ \AA}$ respectively for the gel and the fluid phase, with a slight reduction of d_b in fluid phase over hydration. It is slightly smaller than what is described in the literature for the gel phase with 44.2 \AA (Nagle & Tristram-Nagle, 2000) and the fluid phase with 37.2 \AA (Kucerka et al, 2006). This can be explained by our definition of the bilayer thickness that is from the middle of the polar head to the middle of the opposite polar head and therefore does not comprise the complete polar head. Our NSLD analysis from *Figure 6* reproduces the known dehydration-thickening of stacked fluid PC lipid bilayers (Stachura et al, 2019). As a result, the obtained χ versus d_w curves of DPPC from *Figure 5* agree reasonably well with the literature. Altogether, by comparison with literature, the results obtained on DPPC bilayers validate the methodology employed here.

The DP-DGTS bilayer thickness was never studied before. By following the same experimental procedure as for DPPC bilayers, we observed a decrease of bilayer thickness between the gel and fluid phase, as in DPPC bilayers and as expected upon fatty acid chain melting. However, whatever the phase, the thickness of DP-DGTS bilayers ($45.2 \pm 0.9 \text{ \AA}$ in gel phase and $40.9 \pm 3.8 \text{ \AA}$ in fluid phase) is significantly higher than that of DPPC. Furthermore, the DP-DGTS bilayer thickness in fluid phase seems to respond differently to hydration than that of DPPC, with an increase of several \AA from 75.3% RH to 97.9% RH. In fact, whereas DPPC bilayers follow a dehydration-thickening trend, DP-DGTS bilayers seem to follow a dehydration-thinning trend. The slight decrease of the bilayer thickness upon hydration is expected because the hydration favors disordering of the lipid components of the bilayer as previously reported for DOPC (Stachura et al, 2019). This phenomenon explains the transition between the gel and the fluid phase by simply increasing the humidity.

In order to explore the consequences of the difference of bilayer thickness between DPPC and DP-DGTS in fluid phase, we investigated the mechanical properties of interacting bilayers by analyzing the Bragg sheet profiles. *Figure S7* shows the first two Bragg sheets obtained with DP-DGTS and DPPC in D_2O atmosphere at 99% RH. Plotted are the 2θ -integrated Bragg sheet intensities as functions of Ω , featuring the respective central specular maxima symmetrically flanked by the slowly decaying diffuse scattering intensity. The latter is locally decorated with minima at conditions of high absorption ($\Omega \approx 0$ and $\Omega \approx 2\theta$) and peaks arising from multiple scattering effects (Latza et al, 2020b; Schneck et al, 2011). The solid lines superimposed to the experimental data points represent simulated Bragg sheet intensities corresponding to the best-matching parameters in the continuum-mechanical model simultaneously describing the first and second Bragg sheets as explained in the material and method section. Absorption close to $\Omega \approx 0$ and $\Omega \approx 2\theta$ was modeled as described in (Latza et al, 2020b).

The membrane bending modulus κ is defined as the energy required to deform a membrane from planary to a defined curvature. In our experiment, $\kappa \approx 14 \pm 2 \text{ k}_B\text{T}$ and $\kappa \approx 22 \pm 2 \text{ k}_B\text{T}$ are obtained for DPPC and DP-DGTS, respectively. The value found for DPPC is in agreement with the literature with

κ being measured at 18.3 +/- 3.1 k_BT or 15.0 +/- 1.6 k_BT (Nagle, 2017). The higher bending modulus for DP-DGTS can be explained with the higher bilayer thickness. In fact, according to classical beam theory, the bending rigidity of a homogeneous planar object scales with the third power of the thickness. Application of this relation to the bilayers while simplifying them as homogeneous objects yields the estimate $\kappa_{\text{DGTS}} = \kappa_{\text{DPPC}} \times (d_{\text{DGTS}}/d_{\text{DPPC}})^3 = 14 \text{ k}_B\text{T} \times (41/36)^3 = 21 \text{ k}_B\text{T}$, which is in good agreement despite the considerable simplification.

The inter-membrane compression modulus B is a simple harmonic representation of the interactions between adjacent bilayers in a stack (Nagle & Tristram-Nagle, 2000). We found $B = 29$ MPa for DPPC at RH = 99%, which is consistent with an earlier report of $B = 46$ MPa measured at 60 °C and 95% RH (Schneck et al, 2008), because B decreases systematically with increasing hydration due to the associated decay of the membrane interactions (Mennicke et al, 2006). For DP-DGTS, $B = 1.5$ MPa, a much smaller value than the one for DPPC. Again, the difference can be attributed to the water layer, which is much thicker for DP-DGTS at this humidity (*Figure 5*). Therefore, the compression modulus of DP-DGTS is lower than that of DPPC, reflecting weaker interactions between DP-DGTS bilayers than between DPPC bilayers.

3.5. Swelling limit of DP-DGTS and DPPC bilayers

To obtain the lamellar period of the bilayer at full hydration, we studied multilamellar vesicles (MLV) of DPPC and DP-DGTS in water by SAXS. Because no lamellar scattering signal was observed in fluid phase at 50 °C, the experiment was repeated in the gel phase at 20 °C (*Figure S8*). The SAXS curve of DPPC MLVs shows a first order Bragg peak at $q = 0.085 \text{ \AA}^{-1}$, whereas no peak is observed for DP-DGTS MLVs. For DPPC MLVs the peak is attributed to the diffraction from the periodic lamellar structure and it indicates a repeat distance of 72 Å, slightly higher than what is reported in the literature, i.e. 67 Å (Nagle & Tristram-Nagle, 2000). The full width at half maximum of the peak is 0.015 Å⁻¹. The absence of peak for DP-DGTS MLV indicates that the periodic multilamellar structure is observed above the background level, indicating a very weak correlation between DP-DGTS bilayer in bulk water.

We therefore performed SANS measurements, the technique being sensitive to the deuterium/hydrogen SLD difference used to increase the contrast (*Figure 7*). For DPPC, the periodic lamellar structure indicates a repeat distance of 65.8 Å in the gel phase at T = 20 °C and 67.8 Å in the fluid phase at T = 50 °C, confirming the SAXS results for the gel phase. Furthermore, the DPPC fluid phase result is coherent with the literature that reports a repeat distance between 64.5 Å to 67.2 Å at 50 °C (Zhang et al, 1996). However, for DP-DGTS, a Bragg peak could hardly be identified, confirming the SAXS results and indicating a very weak correlation between membranes. A fit to the weak intensity

modulations in the data yields the repeat distance of 190 Å in the gel phase at 20 °C and 210 Å in the fluid phase at 50 °C.

This indicates the presence of a long-range repulsive contribution to the interaction between DP-DGTS bilayers that is not present for DPPC bilayers. Altogether, these data indicate that the interaction between DP-DGTS bilayers is more repulsive than that between DPPC bilayers, especially at long interaction distance. As speculated before, the reason might be due to incomplete charge-neutrality when a certain small fraction of DP-DGTS molecules deviate from the zwitterionic state.

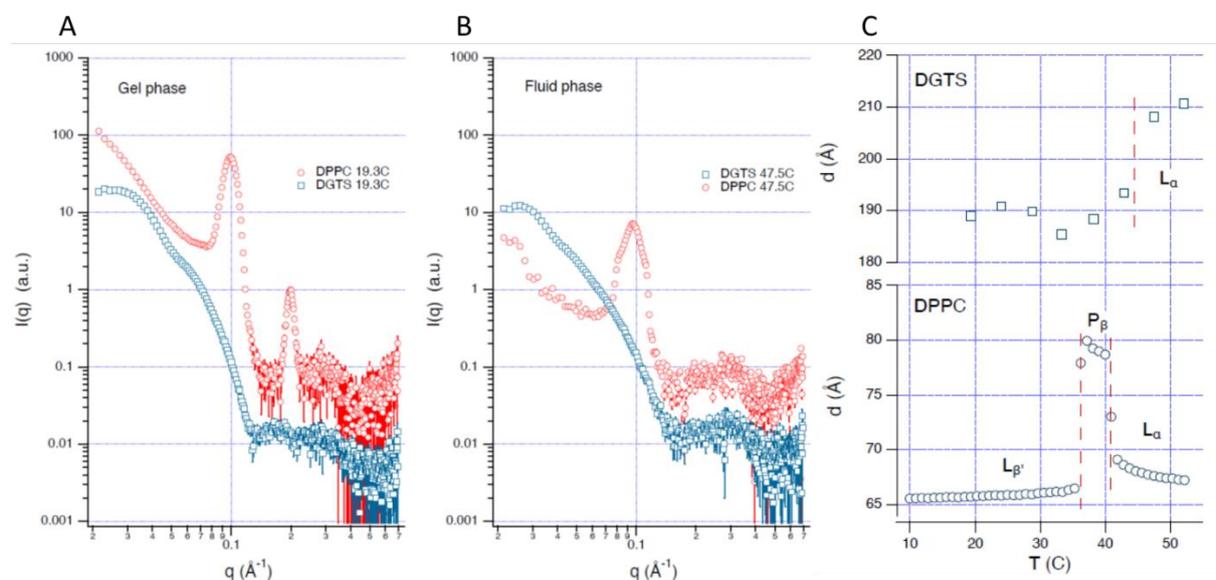


Figure 7. A and B. SANS scattering curves of multilamellar vesicles made of DP-DGTS (blue symbols, scaled by 10) and DPPC lipids (red symbols) in gel phase **A** ($T = 19.3$ °C) or in fluid phase **B** ($T = 47.5$ °C). **C.** Lamellar period of DGTS and DPPC as a function of temperature. For DPPC, the two phase transition temperatures are directly deduced from the sharp period changes and represented by the vertical dashed lines. For DGTS, where no sharp change is observed the dashed line corresponds to the gel-fluid transition temperature (43.8 °C) obtained by DSC (*Figure 2*).

3.6. Molecular dynamics simulations of DP-DGTS and DPPC bilayer

To further investigate the interactions between bilayers, we employ molecular dynamics (MD) simulations, which are able to model hydrated bilayer systems (Tieleman et al, 1997) and thus became an eminent tool for connecting theory with experiment (Kanduč et al, 2017). The Thermodynamic Extrapolation method that we developed and refined over the last decade (Schlaich et al, 2015; Schneck et al, 2012) allows us to efficiently perform simulations at prescribed chemical potential and thus to obtain the interaction pressures between membranes with high precision, both in the fluid and in the gel state (*Figure S9*). Snapshots of our simulations in fluid and gel states are presented in *Figure S2*.

Figure S9 shows that the simulation data are in good agreement with the measurement from *Figure 4*. We extracted first from the simulations the hydration dependence of the bilayer thickness

(*Figure S10.A and B*). We can compare d_b in the experiments (circles) and simulations (triangles) because d_b has a consistent definition based on NSLD profiles as described in the materials and methods section. The simulations reproduce the significant difference between the bilayer thicknesses of DPPC and DP-DGTS in gel and fluid states, DP-DGTS bilayers being thicker than DPPC bilayers. Furthermore, the simulations reproduce pretty precisely the hydration dependence of the bilayer thickness of DPPC, while the hydration dependence of the bilayer thickness of DGTS is not fully reproduced. In the next step, we compare the hydration pressure as a function of the water layer thickness d_w from simulations (triangles) with experimental data (circles) in DP-DGTS and DPPC bilayer (*Figure S10.C and D*). For DPPC in gel and fluid states, we observe excellent agreement between experimental and simulated pressure-distance curves, indicating that our model represents well the hydration forces between DPPC bilayers. The simulations also reproduce the more repulsive interaction pressure of DP-DGTS bilayers as compared to DPPC bilayers for the same water layer thickness. However, the difference obtained by the simulations is not quite as pronounced as observed in the experiments. This discrepancy may be attributed to the fact that any deviation from charge-neutrality, which may occur in the experimental system due to lipid (de-)protonation effects (see discussion above), is not captured by the simulations, because the molecules are constructed strictly zwitterionic. The observed difference between the pressure-distance curves of DPPC and DP-DGTS in the simulations therefore must be attributed to different characteristics of the hydration repulsion.

In order to better understand the difference, we extracted the density profiles of the simulated bilayers in the liquid phase versus the position z normal to the bilayer plane (*Figure 8.a and b*). The densities are extracted for individual lipid moieties and it shows that the trimethylammonium group is the most external group of the bilayer for both lipids. The profiles confirm once again that DP-DGTS bilayers are thicker than DPPC bilayer whatever the hydration, by approximately 6 Å in this representation.

Comparison of the density profiles in *Figure 8.a*, however, does not show any significant dehydration thinning of DP-DGTS bilayer as observed in neutron diffraction experiments. Interestingly, a water layer strongly bound to the polar head of DP-DGTS is manifested as a shoulder in *Figure 8.a*, whereas this shoulder is absent in *Figure 8.b* for DPPC bilayers. If upon hydration, some water molecules penetrate within the DP-DGTS polar head layer beneath the tetramethylammonium group, it might explain the relative thickening of the membrane we observed by neutron diffraction since the neutron SLD profile is sensitive only to the polar head position. The difference of water interaction between DP-DGTS and DPPC bilayers is also reflected in the water polarization profiles in *Figure 8.d*, obtained from the simulated water charge density profiles $m_w(z) = \int_{-d/2}^z \rho_w^{(c)}(z') dz'$, where the lamellar repeat distance d equals the size of the simulation box in z -direction. For DPPC, water gets strongly polarized and therefore oriented close to the membrane surfaces and this polarization decays

smoothly towards the center of the water layer (*Figure 8.d*) (Kanduč et al, 2017), which is expected from simple continuum modeling (Marcelja & Radic, 1976). On the opposite, for DP-DGTS water polarization is strongly influenced by the negatively charged carboxylate group inside the polar head region, indicating a strong interaction that is not observed between the water molecules and the phosphate groups in DPPC.

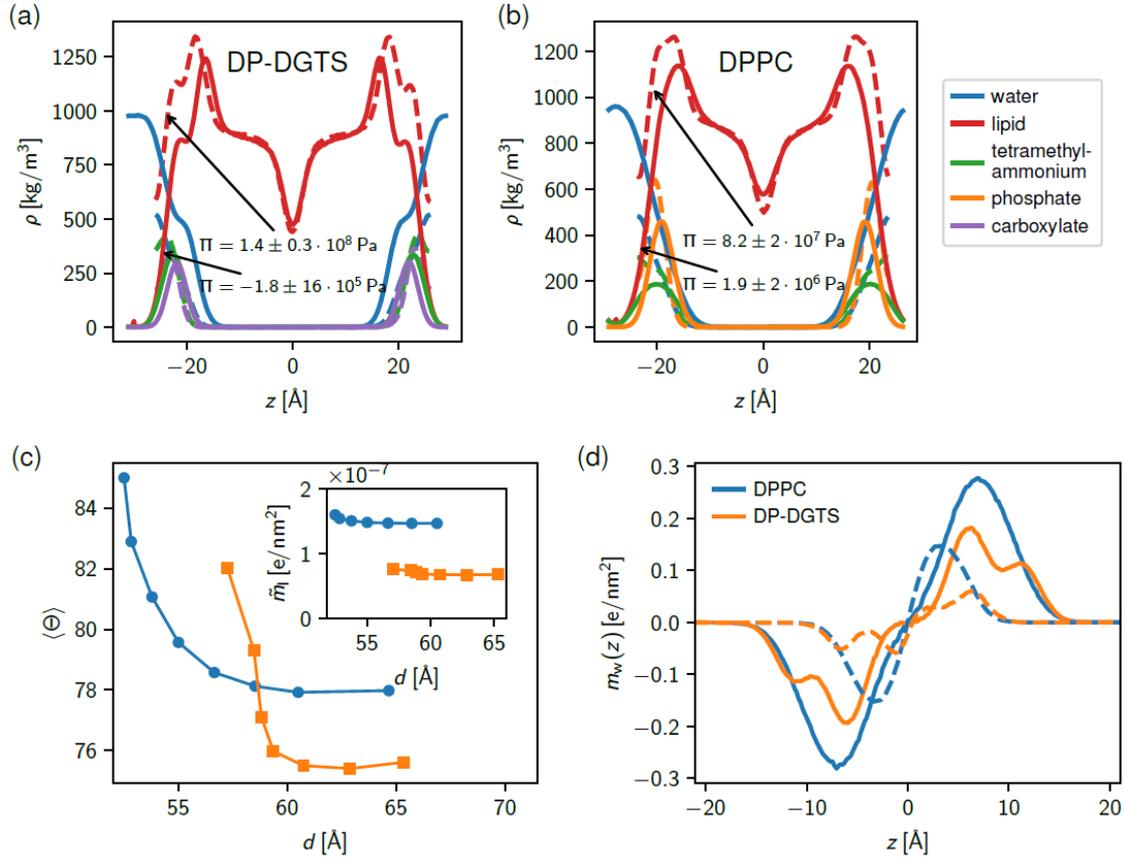


Figure 8. Results of the molecular dynamic simulation. Simulated mass density profiles of the lipids and the water versus the distance z along the bilayer normal in fluid phase at low hydration shown as dashed lines and at high hydration shown as solid lines for DP-DGTS (a) and DPPC (b), centered at the bilayer center of mass. Also shown are the densities of the zwitterionic functional groups of the lipid heads (e.g., phosphate, carboxyl group, trimethylammonium). (c) Median of the orientation of the DP-DGTS (orange) and DPPC (blue) lipid zwitterionic headgroup vector in fluid phase as function of the repeat distance d . 90° corresponds to an orientation parallel to the membrane plane. Upon dehydration (decreasing repeat distance), the headgroups align more parallel to the surface due to favorable electrostatic interactions. However, the dipole orientation of DPPC polar head is slightly more parallel to the membrane plane than DP-DGTS dipole. The inset represents the membrane dipole density vs. d , indicating despite an orientation more parallel to the membrane, DPPC dipole density is larger than that of DP-DGTS. (d) Water dipole density profile versus the distance z along the bilayer normal in fluid phase for DP-DGTS bilayers in orange and DPPC bilayers in blue, centered here at the middle of the water layer on the opposite of panel (a) and (b), where the bilayer is centered. The dash lines represent the profile at low hydration and the plane lines at high hydration.

To further characterize the hydration forces, we analyzed in *Figure 8.c*, the headgroup orientation with respect to the membrane normal. In detail, for DP-DGTS, the tetramethylammonium-carboxylate vector is used, whereas for DPPC, the phosphate-tetramethylammonium vector is used. For

DPPC, we find that the headgroup is predominantly aligned parallel to the surface, especially at low hydration (θ from 85 deg at low hydration up to 78 deg at high hydration) as previously observed (Kanduč et al, 2017). In contrast, for DP-DGTS the headgroup vector is predominantly more perpendicular to the surface (θ from 83 deg at low hydration up to 76 deg at high hydration), which at first glance appears to suggest a more repulsive dipole configuration in line with the more repulsive pressure-distance curve of DP-DGTS. However, a more quantitative analysis of the total dipole moment of the membranes in terms of the polarization densities [\sim m] (see inset of *Figure 8.c*) reveals that the DP-DGTS surfaces have only about half the dipole strength of DPPC surfaces, the reason being the much smaller dipole length in DP-DGTS (1 carbon linking the nitrogen to the carboxylate group for DP-DGTS vs. 2 carbons and one oxygen linking nitrogen and the phosphate for DPPC) and the intramolecular charge distribution. Thus, the more long-ranged nature of the repulsion observed between DP-DGTS bilayers cannot simply be attributed to the polar head orientation.

To summarize our main findings from physical experiments and simulations, we found that DP-DGTS bilayers are significantly thicker than DPPC bilayers, and therefore have higher bending rigidity. Moreover, DP-DGTS bilayers have a greater tendency than DPPC bilayers to coexist in gel and fluid phase. This may be indicative of a low inter-phase line tension, which may be a consequence of the low thickness mismatch between fluid and gel phase, because the fluid phase is almost as thick as the gel phase. Finally, DP-DGTS bilayers have more repulsive hydration interactions than DPPC bilayers at short-range and more repulsive long-range interactions, possibly of electrostatic origin.

3.7. Phylogeny of the gene involved in DGTS synthesis

Therefore, our results obtained by neutron diffraction and MD simulations indicate that the polar heads of DGTS and PC have different biophysical properties that lead to different characteristics of the formed bilayer membranes.

Seed plants lack betaine lipids, whereas green algae, ferns and mosses only synthesize DGTS, and marine organisms show the three betaine lipids DGTS, DGTA and DGCC. Surprisingly, the green model unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* totally lacks PC, relying only on DGTS. This has raised the question of whether the marine environment applies a selection pressure leading to a wider range of betaine lipid diversity. DGTS is biosynthesized in a two-step reaction catalyzed either by two enzymes BtaA and BtaB in prokaryotes, or by a bifunctional enzyme (Bta1 in *Chlamydomonas reinhardtii*) in eukaryotes. Bta1 harbors both BtaA and BtaB domains (Riekhof et al, 2005a; Riekhof et al, 2005b). By domain sequence homology we retrieved Bta1 amino acid sequences from at least 14 families of eukaryotes, bacteria and archaea and performed separate Bayesian phylogenetic analyses on

each domain (Figure 9 and Figure S11) because in eukaryotes BtaA and BtaB are arranged in two different configurations (Murakami et al, 2018).

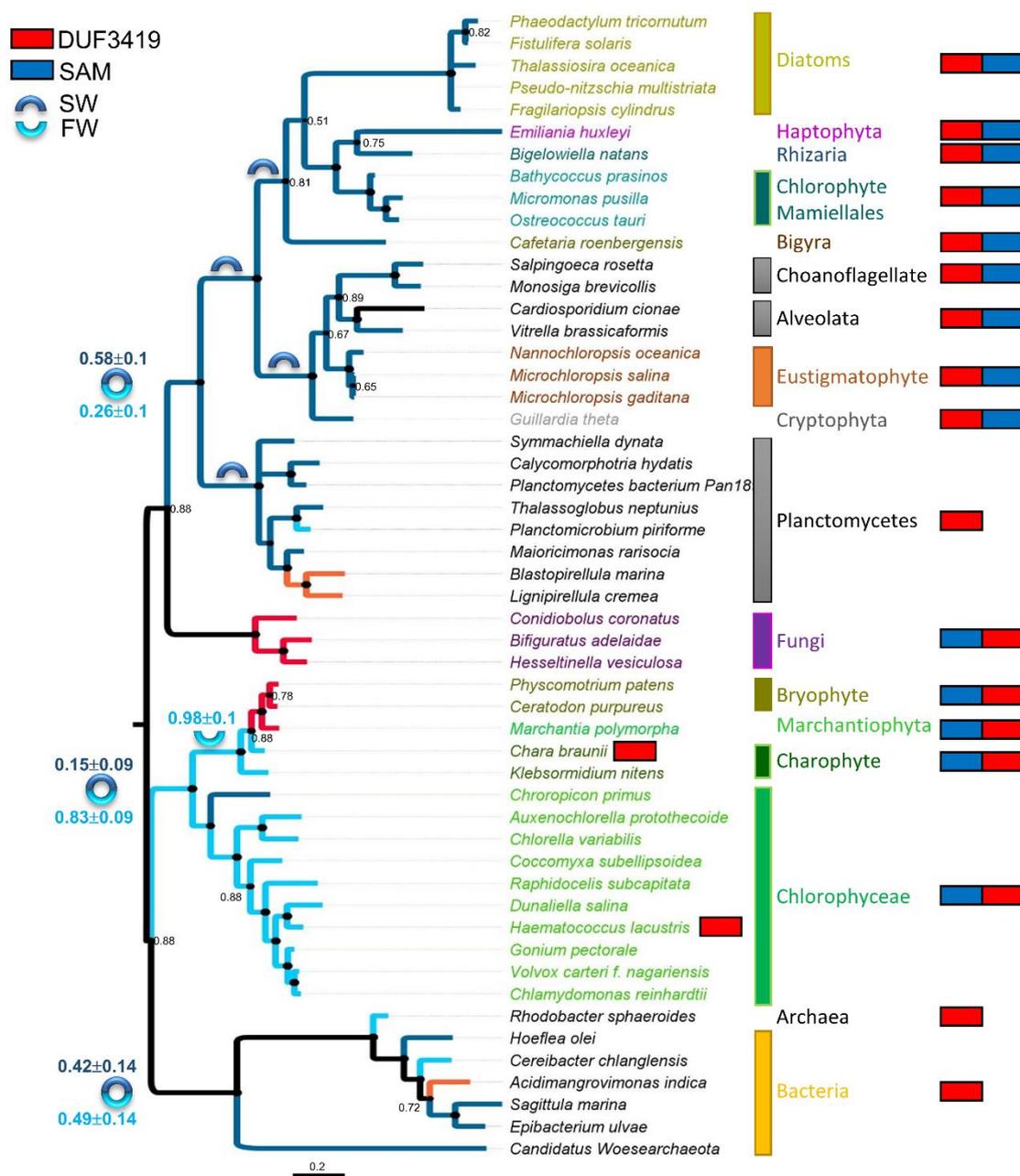


Figure 9. Phylogenetic tree of the 3-amino-3-carboxypropyl-transferase domain of the BTA1 protein from SAR representatives (diatoms, eustigmatophytes), Haptophytes, Cryptophytes, Mamiellales, Chaonoflagellates, alveolates, fungi, bryophytes, charophytes, Chlorophyceae, and bacteria. The tree presented was inferred by Bayesian analysis as described in the Materials and Methods section and the topology overlaps Maximum Likelihood tree topology. Bayesian Posterior Probability values below 0.90 are reported at each node. Node circle size was drawn in scale to the BPP value. The color of the clades and branches identifies the habitat as validated by bibliographic survey. **Dark blue** = seawater; **light blue** = freshwater; **red**: terrestrial organism; **orange**: brackish water organism. At each internal node, the BPP for the habitat of the ancestor is indicated besides the sign if below 1.00. On the right-hand side the configuration of the protein is reported; **red**: 3-amino-3-carboxypropyl-transferase domain (Domain of Unknown Function DUF3419); **blue**: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase (SAM).

The phylogenetic tree shows a robust separation between marine and freshwater organisms (posterior probability 1.00) and does not corroborate taxonomy (Burki et al, 2010; Ochoa de Alda et al, 2014; Stiller et al, 2014). Such clustering overlaps with the domain arrangement, i.e. BtaA-BtaB in marine organisms vs. BtaB-BtaA in freshwater ones. Interestingly, the planctomycete (a clade of marine bacteria characterized by a unique intracellular architecture (Fuerst & Sagulenko, 2011)) sequences robustly (PP 0.92) cluster basally to the clade containing all marine protists and algae, whereas Archaea and other bacteria form a clade in basal position. Also intriguing is the position of the marine mamiellales (Chlorophyta) such as *Ostreococcus taurii* clustering together with the haptophyte *Emiliania huxleyi* (PP 0.99), and diatoms (PP 0.51) such as *Phaeodactylum tricorutum*, while other terrestrial chlorophytes cluster together in a separate clade. The habitat was taken into consideration as a character in a bi-partitioned Bayesian analysis and results suggest either that the two BtaA domains split very early in the evolution (around 1.5 billion years ago) and then evolved separately in marine and freshwater organisms, or that two distinct lateral gene transfers occurred. The probability that the Last Universal Common Ancestor (LUCA) harbored a BtaA domain similar to the marine or the freshwater organisms is not decisive (0.42 +/- 0.14 and 0.49 +/- 0.14 respectively). Contrariwise, the Most Recent Common Ancestor (MRCA) of freshwater plants highly likely presented a freshwater BtaA domain (0.83 +/- 0.09). Along evolution, habitat switches are detectable as homoplasies (*Chloropicon primus* being a marine species along with the terrestrial liverwort and non-vascularized plants) or synapomorphies (the terrestrial fungi) in the tree. If a single lateral gene transfer occurred, then physico-chemical variables of the marine environment, such as the osmotic pressure, may shape betaine lipid diversity and drive the evolution of *Bta1* gene. Evolving in an environment depleted of such selection may lead to organisms deprived of betaine lipids and *Bta1* gene.

4. Discussion

Betaine lipids have been reported in the literature for a long time to be a good substitute replacement for phospholipids in cellular membrane, especially in phosphate starvation condition. During the evolution, DGTS is present in bacteria. To our current knowledge, DGTA and DGCC appeared later only in photosynthetic marine organisms derived from secondary endosymbiosis (Canavate et al, 2016). The biosynthetic pathways conducting to DGTA and DGCC are still unknown, only biochemical investigations were conducted and no phylogenetic analyses could be achieved. Biosynthesis of DGTS is realized in bacteria in two steps by BtaA and BtaB (Riekhof et al, 2005a). Eukaryotic Bta1 harbors two domains in opposite orientations: the BtaA-BtaB in marine organisms and BtaB-BtaA in freshwater ones (*Figure 9* and *Figure S11*). This dual evolution of the DGTS gene might mirror different selection pressure acting on marine and freshwater environments.

In marine environment, cells experience high osmotic pressure, the opposite occurs for freshwater organisms. The ocean osmolarity was measured at 1013 mOsm.L⁻¹ creating a pressure around 2.6 MPa, whereas the osmolality of fresh water is typically below 7 mOsm.L⁻¹, below 0.02 MPa (Raven & Doblin, 2014). Marine organisms are naturally rich in very long chain polyunsaturated fatty acids (VLC-PUFAs) - i.e. 20:5 and 22:6 - whereas freshwater organisms contain only medium chain (16 or 18 carbon) PUFAs. A correlation between the marine habitat and the synthesis of VLC-PUFA was suggested (Li-Beisson et al, 2019; Valentine & Valentine, 2004). Furthermore, salt increases VLC-PUFA production in algae (An et al, 2013).

We show that the DP-DGTS bilayer in fluid phase is in average 6 Å thicker than that of DPPC bilayer (*Figure 6*), the difference being less pronounced at low hydration, corresponding to high osmotic pressure and the environment of marine organisms, than at high hydration corresponding to low osmotic pressure and the environment of freshwater organisms. Furthermore, DP-DGTS is more rigid than DPPC, which is consistent with the measurement of a thicker bilayer. We also found that the compression modulus is twenty times higher in DPPC than DP-DGTS, plausibly reflecting that the bilayers only interact very weakly when the water layer is much larger but also that the bilayer thicknesses are different. We also demonstrated that, in bulk water, DP-DGTS membranes are much more repulsive than DPPC membranes, that might be the mirror of unscreened electrostatic repulsion. Altogether, these results indicate that DGTS and PC have different biophysical properties that lead to different characteristics of the formed bilayer membranes. In this condition, these two lipids might not be always a good substitute for each other.

In vivo, in marine organisms, DGTS and PC do not share the same fatty acid composition. Including PUFAs in phospholipid membranes affect the physical properties of the membranes by increasing disorder and decreasing thickness (Fernandes et al, 2002). For instance, in *Microchloropsis gaditana*, a eustigmatophyte (stramenopile) marine microalgae, DGTS is richer in 20:5 than PC that contain mainly 16 and 18 carbon fatty acids with 0, 1 or 2 unsaturations (Billey et al, 2021). Thus, depleting the PC of PUFAs could increase the membrane thickness as well as the energy required for deformation, leading to a higher bending rigidity (Vasquez et al, 2014). Therefore, the variation of fatty acid composition observed between PC and DGTS *in vivo* could contribute to have matching physicochemical properties of these two lipids and favor the replacement of one lipid by another depending on the availability of phosphorus in the marine environment (Canavate et al, 2017a; Van Mooy et al, 2009).

However, freshwater organisms and plants do not produce very long chain polyunsaturated fatty acid, they mainly contain fatty acid with 16 or 18 carbons. Therefore, they could not adapt their membrane thickness difference by changing their fatty acid chain length (Li-Beisson et al, 2019). Freshwater organisms with significant fraction of betaine lipids in their composition usually have little

or no PC (Sato & Furuya, 1985). Even some algae contain only betaine lipids and no PC such as *Chlamydomonas reinhardtii* whereas some other do not contain betaine lipid and only PC such as *Chlorella sorokinia* (Giroud et al, 1988; Widzowski et al, 2020). Nonetheless, it was found very recently that in phosphate starvation *Chlorella kessleri* replaced completely PC by DGTS although it was previously thought to be a non-betaine lipid-producing alga (Oishi et al, 2022). Therefore, we could suppose that the inability of freshwater organisms to make PC and DGTS “compatible” through adjustments of the fatty acid chain length and unsaturation forces these organisms to avoid PC/DGTS mixed bilayers. However, these organisms conserve their pathway to synthesize DGTS to maintain the possibility to use betaine lipids to face phosphate starvation by erasing the PC.

For land plants, the situation is different. Terrestrial environments are overall characterized by water scarcity and therefore, osmotic pressure is not driven by osmolyte but by water abundance (Raven & Doblin, 2014). Plant water status is typically described in terms of “water potential,” a measure of the free energy status of water relative to pure water at a reference state. Water potentials of 0 to -0.3 MPa are typical of well-watered plants, whereas water potentials of -1.5 to -2.0 MPa represent severe stress and permanent loss of turgor for many plants during drought (Haswell & Verslues, 2015). It means that the osmotic pressure in cells from land plants is much more variable than the one from algae cells.

The likely sequence of events leading to the colonization of land by plants is that some marine green algae (Chlorophyta) first adapted to freshwater habitats, then some eventually evolved into land plants (Rensing, 2018; Zhang et al, 2022). Land plants share with the freshwater organisms the membrane lipid fatty acid composition, mainly medium chain fatty acids. The loss of desiccation tolerance is concomitant to the loss of DGTS synthesis. Phylogenetic analyses suggest that vegetative desiccation tolerance was primitively present in the bryophytes (the basal-most living clades of land plants), but was then lost in the evolution of tracheophytes and therefore in seed plant (Oliver et al, 2000). Indeed, DGTS synthesis genes are absent in gymnosperms and angiosperms and DGTS was never detected in these clades. DGTS was detected in some mosses and ferns but not in every species and when it is analysed in ferns or mosses, it is often degraded during dry season such as summer (Guschina et al, 2002; Rozenstvet, 2004; Rozenstvet et al, 2001). In the model moss *Physcomitrium patens*, the DGTS gene is present and annotated but only one chemical molecule of DGTS was recently detected in very low abundance in living tissue (Resemann et al, 2021; Resemann et al, 2019). Therefore, as for freshwater algae, it seems in land plants that there is very few coexistence of DGTS and PC inside membranes and that DGTS presence is correlated to desiccation tolerance.

Why desiccation tolerance is concomitant to DGTS disappearance is still a mystery but maybe the variation of the water layer thickness in the DGTS polar head region upon dehydration might modify membrane properties such as membrane thickness and protein insertion. Seed plants (angiosperm and gymnosperm) do not contain a DGTS synthase gene in their genome and the development cycle of these

organisms goes through a highly desiccated structure that is the seed. Maybe the presence of DGTS became deleterious for seed formation. To support this hypothesis, we tried to obtain *Arabidopsis thaliana* plant overexpressing DGTS synthase but we failed to obtain any seeds so far. Therefore to cope with phosphate deprivation, seed plants adopted another strategy than betaine lipid: they replace their phospholipids by the glycolipid DGDG and SQDG (Nakamura, 2013) but at the opposite of algae they cannot degrade all their phospholipids because physicochemical properties of phospholipids and glycolipids are much more different from PC and DGTS at a constant hydrostatic pressure (Kanduč et al, 2017).

To conclude, in marine organisms where VLC-PUFAs are present, DGTS and PC can coexist within the same bilayer because the bilayer thickness can be kept homogenous by adapting its fatty acid composition. The environment pressure on betaine lipid evolution was therefore lower and allowed marine organisms to produce other forms of betaine lipids such as DGTA and DGCC. Betaine lipids in these conditions are a good substitute for PC during phosphate starvation. In freshwater organisms, coexistence of PC and DGTS is scarce and usually with one dominating the other in terms of abundance in the membrane. The hypothesis of the absence of VLC-PUFA that would allow DGTS and PC bilayer to have similar thickness needs to be experimentally validated. The correlation between the loss of desiccation tolerance and the loss of DGTS is intriguing. Is the difference of bilayer thickness between DGTS and PC involved in this process? This property might be an explanation for the progressive disappearance of betaine lipids in land plants. Further investigations are needed to address this question; one would be to produce *Arabidopsis thaliana* plant containing DGTS and investigate its properties and architecture during drought.

5. References

- Abida H, Dolch LJ, Mei C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, Rebeille F, Petroustos D, Jouhet J, Marechal E (2015) Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* **167**: 118-136
- Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1-2**: 19-25
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schaffer AA, Yu YK (2005) Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J* **272**: 5101-5109
- An M, Mou S, Zhang X, Zheng Z, Ye N, Wang D, Zhang W, Miao J (2013) Expression of fatty acid desaturase genes and fatty acid accumulation in *Chlamydomonas* sp. ICE-L under salt stress. *Bioresour Technol* **149**: 77-83
- Andersson MX, Larsson KE, Tjellstrom H, Liljenberg C, Sandelius AS (2005) Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* **280**: 27578-27586
- Berendsen HJC, Grigera JR, Straatsma TP (1987) The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J Phys Chem-US* **91**: 6269-6271
- Berendsen HJC, Postma JPM, Vangunsteren WF, Dinola A, Haak JR (1984) Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *Journal of Chemical Physics* **81**: 3684-3690

- Berger O, Edholm O, Jahnig F (1997) Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys J* **72**: 2002-2013
- Billey E, Magneschi L, Leterme S, Bedhomme M, Andres-Robin A, Poulet L, Michaud M, Finazzi G, Dumas R, Crouzy S, Lauer F, Fourage L, Rebeille F, Amato A, Collin S, Jouhet J, Marechal E (2021) Characterization of the Bubblegum acyl-CoA synthetase of *Microchloropsis gaditana*. *Plant Physiol* **185**: 815-835
- Braganza LF, Worcester DL (1986) Hydrostatic pressure induces hydrocarbon chain interdigitation in single-component phospholipid bilayers. *Biochemistry* **25**: 2591-2596
- Brown AE, Elovson J (1974) Isolation and characterization of a novel lipid, 1(3),2-diacylglyceryl-(3)-O-4'-(N,N,N-trimethyl)homoserine, from *Ochromonas danica*. *Biochemistry* **13**: 3476-3482
- Burki F, Kudryavtsev A, Matz MV, Aglyamova GV, Bulman S, Fiers M, Keeling PJ, Pawlowski J (2010) Evolution of Rhizaria: new insights from phylogenomic analysis of uncultivated protists. *BMC Evol Biol* **10**: 377
- Bussi G, Donadio D, Parrinello M (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics* **126**
- Canavate JP, Armada I, Hachero-Cruzado I (2017a) Aspects of phosphorus physiology associated with phosphate-induced polar lipid remodelling in marine microalgae. *J Plant Physiol* **214**: 28-38
- Canavate JP, Armada I, Hachero-Cruzado I (2017b) Interspecific variability in phosphorus-induced lipid remodelling among marine eukaryotic phytoplankton. *New Phytol* **213**: 700-713
- Canavate JP, Armada I, Rios JL, Hachero-Cruzado I (2016) Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* **124**: 68-78
- Crisuolo A, Gribaldo S (2010) BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* **10**: 210
- Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *Journal of Chemical Physics* **98**: 10089-10092
- Dembitsky VM (1996) Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology. *Prog Lipid Res* **35**: 1-51
- Demé B, Cataye C, Block MA, Marechal E, Jouhet J (2014) Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J* **28**: 3373-3383
- Demé B, Dubois M, Gulik-Krzywicki T, Zemb T (2002a) Giant collective fluctuations of charged membranes at the lamellar-to-vesicle unbinding transition. 1. Characterization of a new lipid morphology by SANS, SAXS, and electron microscopy. *Langmuir* **18**: 997-1004
- Demé B, Dubois M, Zemb T (2002b) Giant collective fluctuations of charged membranes at the lamellar-to-vesicle unbinding transition. 2. Equation of state in the absence of salt. *Langmuir* **18**: 1005-1013
- Dowhan W (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem* **66**: 199-232
- Drazenovic J, Wang H, Roth K, Zhang J, Ahmed S, Chen Y, Bothun G, Wunder SL (2015) Effect of lamellarity and size on calorimetric phase transitions in single component phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1848**: 532-543
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792-1797
- Eichenberger W (1993) Betaine Lipids in Lower Plants - Distribution of Dgts, Dgta and Phospholipids, and the Intracellular-Localization and Site of Biosynthesis of Dgts. *Plant Physiol Bioch* **31**: 213-221
- Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG (1995) A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *Journal of Chemical Physics* **103**: 8577-8593
- Fernandes MX, Castanho MA, Garcia de la Torre J (2002) Brownian dynamics simulation of the unsaturated lipidic molecules oleic and docosahexaenoic acid confined in a cellular membrane. *Biochim Biophys Acta* **1565**: 29-35
- Fuerst JA, Sagulenko E (2011) Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nat Rev Microbiol* **9**: 403-413
- Giroud C, Gerber A, Eichenberger W (1988) Lipids of *Chlamydomonas-Reinhardtii* - Analysis of Molecular-Species and Intracellular Site(S) of Biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **29**: 587-595
- Gonthier J, Barrett MA, Aguetz O, Baudoin S, Bourgeat-Lami E, Deme B, Grimm N, Hauss T, Kiefer K, Lelievre-Berna E, Perkins A, Wallacher D (2019) BerILL: The ultimate humidity chamber for neutron scattering. *Journal of Neutron Research* **21**: 65-76
- Guschina IA, Harwood JL, Smith M, Beckett RP (2002) Abscisic acid modifies the changes in lipids brought about by water stress in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytol* **156**: 255-264
- Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* **4**: 17
- Harroun TA, Katsaras J, Wassall SR (2008) Cholesterol is found to reside in the center of a polyunsaturated lipid membrane. *Biochemistry* **47**: 7090-7096

- Haswell ES, Verslues PE (2015) The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *J Gen Physiol* **145**: 389-394
- Jacrot B (1976) Study of Biological Structures by Neutron-Scattering from Solution. *Rep Prog Phys* **39**: 911-953
- Janero DR, Barnett R (1982) Isolation and characterization of an ether-linked homoserine lipid from the thylakoid membrane of *Chlamydomonas reinhardtii* 137+. *J Lipid Res* **23**: 307-316
- Jorgensen WL, Tirado-Rives J (1988) The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J Am Chem Soc* **110**: 1657-1666
- Jouhet J, Marechal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* **167**: 863-874
- Kanduć M, Schlaich A, de Vries AH, Jouhet J, Marechal E, Deme B, Netz RR, Schneck E (2017) Tight cohesion between glycolipid membranes results from balanced water-headgroup interactions. *Nat Commun* **8**: 14899
- Kato M, Sakai M, Adachi K, Ikemoto H, Sano H (1996) Distribution of betaine lipids in marine algae. *Phytochemistry* **42**: 1341-1345
- Kowalik B, Schlaich A, Kanduc M, Schneck E, Netz RR (2017) Hydration Repulsion Difference between Ordered and Disordered Membranes Due to Cancellation of Membrane-Membrane and Water-Mediated Interactions. *J Phys Chem Lett* **8**: 2869-2874
- Kowalik B, Schubert T, Wada H, Tanaka M, Netz RR, Schneck E (2015) Combination of MD Simulations with Two-State Kinetic Rate Modeling Elucidates the Chain Melting Transition of Phospholipid Bilayers for Different Hydration Levels. *J Phys Chem B* **119**: 14157-14167
- Kucerka N, Tristram-Nagle S, Nagle JF (2006) Closer look at structure of fully hydrated fluid phase DPPC bilayers. *Biophys J* **90**: L83-85
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **35**: 1547-1549
- Kunzler K, Eichenberger W (1997) Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi. *Phytochemistry* **46**: 883-892
- Kunzler K, Eichenberger W, Radunz A (1997) Intracellular localization of two betaine lipids by cell fractionation and immunomicroscopy. *Z Naturforsch C J Biosci* **52**: 487-495
- Latza VM, Deme B, Schneck E (2020a) Membrane Adhesion via Glycolipids Occurs for Abundant Saccharide Chemistries. *Biophysical Journal* **118**: 1602-1611
- Latza VM, Deme B, Schneck E (2020b) Membrane Adhesion via Glycolipids Occurs for Abundant Saccharide Chemistries. *Biophys J* **118**: 1602-1611
- Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* **25**: 1307-1320
- Lei N, Safinya CR, Bruinsma RF (1995) Discrete Harmonic Model for Stacked Membranes - Theory and Experiment. *J Phys Li* **5**: 1155-1163
- Li-Beisson Y, Thelen JJ, Fedosejevs E, Harwood JL (2019) The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* **74**: 31-68
- Lide DR. (2005) CRC handbook of physics and chemistry. In Lide DR (ed.). CRC Press, Boca Raton.
- Lis LJ, Mcalister M, Fuller N, Rand RP, Parsegian VA (1982) Interactions between Neutral Phospholipid-Bilayer Membranes. *Biophysical Journal* **37**: 657-665
- Maciejewski A, Pasenkiewicz-Gierula M, Cramariuc O, Vattulainen I, Rog T (2014) Refined OPLS all-atom force field for saturated phosphatidylcholine bilayers at full hydration. *J Phys Chem B* **118**: 4571-4581
- Makewicz A, Gribi C, Eichenberger W (1997) Lipids of *Ectocarpus fasciculatus* (Phaeophyceae). Incorporation of [1-C-14]oleate and the role of TAG and MGDG in lipid metabolism. *Plant and Cell Physiology* **38**: 952-960
- Marcelja S, Radic N (1976) Repulsion of Interfaces Due to Boundary Water. *Chem Phys Lett* **42**: 129-130
- Matsuki H, Goto M, Tada K, Tamai N (2013) Thermotropic and barotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers. *Int J Mol Sci* **14**: 2282-2302
- Mennicke U, Constantin D, Salditt T (2006) Structure and interaction potentials in solid-supported lipid membranes studied by X-ray reflectivity at varied osmotic pressure. *Eur Phys J E Soft Matter* **20**: 221-230
- Miyamoto S, Kollman PA (1992) Settle - an Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models. *J Comput Chem* **13**: 952-962
- Muhlroth A, Winge P, El Assimi A, Jouhet J, Marechal E, Hohmann-Marriott MF, Vadstein O, Bones AM (2017) Mechanisms of Phosphorus Acquisition and Lipid Class Remodeling under P Limitation in a Marine Microalga. *Plant Physiol* **175**: 1543-1559
- Murakami H, Nobusawa T, Hori K, Shimojima M, Ohta H (2018) Betaine Lipid Is Crucial for Adapting to Low Temperature and Phosphate Deficiency in *Nannochloropsis*. *Plant Physiol* **177**: 181-193

- Nagle JF (2017) Experimentally determined tilt and bending moduli of single-component lipid bilayers. *Chem Phys Lipids* **205**: 18-24
- Nagle JF, Tristram-Nagle S (2000) Structure of lipid bilayers. *Bba-Rev Biomembranes* **1469**: 159-195
- Nakamura Y (2013) Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog Lipid Res* **52**: 43-50
- Ochoa de Alda JA, Esteban R, Diago ML, Houmard J (2014) The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nat Commun* **5**: 4937
- Oishi Y, Otaki R, Iijima Y, Kumagai E, Aoki M, Tsuzuki M, Fujiwara S, Sato N (2022) Diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine-dependent lipid remodeling in a green alga, *Chlorella kessleri*. *Commun Biol* **5**: 19
- Oliver MJ, Tuba Z, Mishler BD (2000) The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* **151**: 85-100
- Pan JJ, Heberle FA, Carmichael JR, Ankner JF, Katsaras J (2012) Time-of-flight Bragg scattering from aligned stacks of lipid bilayers using the Liquids Reflectometer at the Spallation Neutron Source. *J Appl Crystallogr* **45**: 1219-1227
- Parsegian VA, Rand RP (1995) Interaction in Membrane Assemblies. In *Handbook of Biological Physics*, Lipowsky R, Sackmann E (eds), Vol. 1, pp 643-690. North-Holland: Elsevier
- Petrache HI, Dodd SW, Brown MF (2000) Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by ²H NMR spectroscopy. *Biophys J* **79**: 3172-3192
- Raven JA, Doblin MA (2014) Active water transport in unicellular algae: where, why, and how. *J Exp Bot* **65**: 6279-6292
- Rensing SA (2018) Great moments in evolution: the conquest of land by plants. *Curr Opin Plant Biol* **42**: 49-54
- Resemann HC, Herrfurth C, Feussner K, Hornung E, Ostendorf AK, Gomann J, Mittag J, van Gessel N, Vries J, Ludwig-Muller J, Markham J, Reski R, Feussner I (2021) Convergence of sphingolipid desaturation across over 500 million years of plant evolution. *Nat Plants* **7**: 219-232
- Resemann HC, Lewandowska M, Gi Mann J, Feussner I (2019) Membrane Lipids, Waxes and Oxylipins in the Moss Model Organism *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol* **60**: 1166-1175
- Richard D, Ferrand M, Kearley GJ (1996) Analysis and visualisation of neutron-scattering data. *Journal of Neutron Research* **4**: 33-39
- Riekhof WR, Andre C, Benning C (2005a) Two enzymes, BtaA and BtaB, are sufficient for betaine lipid biosynthesis in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **441**: 96-105
- Riekhof WR, Sears BB, Benning C (2005b) Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryot Cell* **4**: 242-252
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574
- Ronquist F, Klopfstein S, Vilhelmsen L, Schulmeister S, Murray DL, Rasnitsyn AP (2012a) A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the hymenoptera. *Syst Biol* **61**: 973-999
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012b) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* **61**: 539-542
- Rozenstvet OA (2004) Comparative examination of distribution of phospholipids and a betaine lipid DGTS in tropical fern species. *Biochemical Systematics and Ecology* **32**: 303-311
- Rozenstvet OA, Saksonov SV, Filin VR, Dembitsky VM (2001) Seasonal changes of lipid content in the leaves of some ferns. *Physiol Plantarum* **113**: 59-63
- Rozenstvet OA (2004) [Distribution of a betaine lipid O-(1,2-diacylglycero)-N,N,N-trimethylhomoserine in tissues of some Lycopodiophyta species]. *Bioorg Khim* **30**: 644-648
- Salditt T (2005) Thermal fluctuations and stability of solid-supported lipid membranes. *J Phys-Condens Mat* **17**: R287-R314
- Salvador-Castell, M., Demé, B., Oger, P., Peters, J., 2020. Structural Characterization of an Archaeal Lipid Bilayer as a Function of Hydration and Temperature. *IJMS* 21, 1816. <https://doi.org/10.3390/ijms21051816>
- Sato N (1991) Lipids in *Cryptomonas Cr-1*. 2. Biosynthesis of Betaine Lipids and Galactolipids. *Plant and Cell Physiology* **32**: 845-851
- Sato N (1992) Betaine Lipids. *Botanical Magazine-Tokyo* **105**: 185-197
- Sato N, Furuya M (1985) Distribution of diacylglyceryltrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in non-vascular green plants. *Plant Sci*: 81-85
- Sato N, Murata N (1991) Transition of lipid phase in aqueous dispersions of diacylglyceryltrimethylhomoserine. *Biochim Biophys Acta* **1082**: 108-111
- Schlaich A, Kowalik B, Kanduc M, Schneck E, Netz RR (2015) Physical mechanisms of the interaction between lipid membranes in the aqueous environment. *Physica A* **418**: 105-125

- Schneck E, Deme B, Gege C, Tanaka M (2011) Membrane adhesion via homophilic saccharide-saccharide interactions investigated by neutron scattering. *Biophys J* **100**: 2151-2159
- Schneck E, Rehfeldt F, Oliveira RG, Gege C, Deme B, Tanaka M (2008) Modulation of intermembrane interaction and bending rigidity of biomembrane models via carbohydrates investigated by specular and off-specular neutron scattering. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **78**: 061924
- Schneck E, Sedlmeier F, Netz RR (2012) Hydration repulsion between biomembranes results from an interplay of dehydration and depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 14405-14409
- Schubert T, Schneck E, Tanaka M (2011) First order melting transitions of highly ordered dipalmitoyl phosphatidylcholine gel phase membranes in molecular dynamics simulations with atomistic detail. *J Chem Phys* **135**: 055105
- Senik SV, Maloshenok LG, Kotlova ER, Shavarda AL, Moiseenko KV, Bruskin SA, Koroleva OV, Psurtseva NV (2015) Diacylglyceryltrimethylhomoserine content and gene expression changes triggered by phosphate deprivation in the mycelium of the basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry* **117**: 34-42
- Shirts MR, Chodera JD (2008) Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. *Journal of Chemical Physics* **129**
- Sinha SK, Sirota EB, Garoff S, Stanley HB (1988) X-ray and neutron scattering from rough surfaces. *Phys Rev B Condens Matter* **38**: 2297-2311
- Stachura SS, Malajczuk CJ, Kuprusevicius E, Mancera RL (2019) Influence of Bilayer Size and Number in Multi-Bilayer DOPC Simulations at Full and Low Hydration. *Langmuir* **35**: 2399-2411
- Stiller JW, Schreiber J, Yue J, Guo H, Ding Q, Huang J (2014) The evolution of photosynthesis in chromist algae through serial endosymbioses. *Nat Commun* **5**: 5764
- Tieleman DP, Marrink SJ, Berendsen HJ (1997) A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochim Biophys Acta* **1331**: 235-270
- Valentine RC, Valentine DL (2004) Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Prog Lipid Res* **43**: 383-402
- Van Mooy BA, Fredricks HF, Pedler BE, Dyhrman ST, Karl DM, Koblizek M, Lomas MW, Mincer TJ, Moore LR, Moutin T, Rappe MS, Webb EA (2009) Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* **458**: 69-72
- Vaskovsky VE, Khotimchenko SV, Boolukh EM (1998) Distribution of diacylglyceroltrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in mushrooms. *Phytochemistry* **47**: 755-760
- Vasquez V, Krieg M, Lockhead D, Goodman MB (2014) Phospholipids that contain polyunsaturated fatty acids enhance neuronal cell mechanics and touch sensation. *Cell Rep* **6**: 70-80
- Wennberg CL, Murtola T, Hess B, Lindahl E (2013) Lennard-Jones Lattice Summation in Bilayer Simulations Has Critical Effects on Surface Tension and Lipid Properties. *Journal of Chemical Theory and Computation* **9**: 3527-3537
- Widzgowski J, Vogel A, Altrogge L, Pfaff J, Schoof H, Usadel B, Nedbal L, Schurr U, Pfaff C (2020) High light induces species specific changes in the membrane lipid composition of *Chlorella*. *Biochem J* **477**: 2543-2559
- Wiener MC, White SH (1991) Fluid bilayer structure determination by the combined use of x-ray and neutron diffraction. I. Fluid bilayer models and the limits of resolution. *Biophys J* **59**: 162-173
- Wolde-Kidan A, Pham QD, Schlaich A, Loche P, Sparr E, Netz RR, Schneck E (2019) Influence of polar co-solutes and salt on the hydration of lipid membranes. *Phys Chem Chem Phys* **21**: 16989-17000
- Worcester DL, Franks NP (1976) Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol bilayers. II. Neutron diffraction. *J Mol Biol* **100**: 359-378
- Zhang R, Tristram-Nagle S, Sun W, Headrick RL, Irving TC, Suter RM, Nagle JF (1996) Small-angle x-ray scattering from lipid bilayers is well described by modified Caille theory but not by paracrystalline theory. *Biophys J* **70**: 349-357
- Zhang Z, Ma X, Liu Y, Yang L, Shi X, Wang H, Diao R, Zhong B (2022) Origin and evolution of green plants in the light of key evolutionary events. *J Integr Plant Biol*

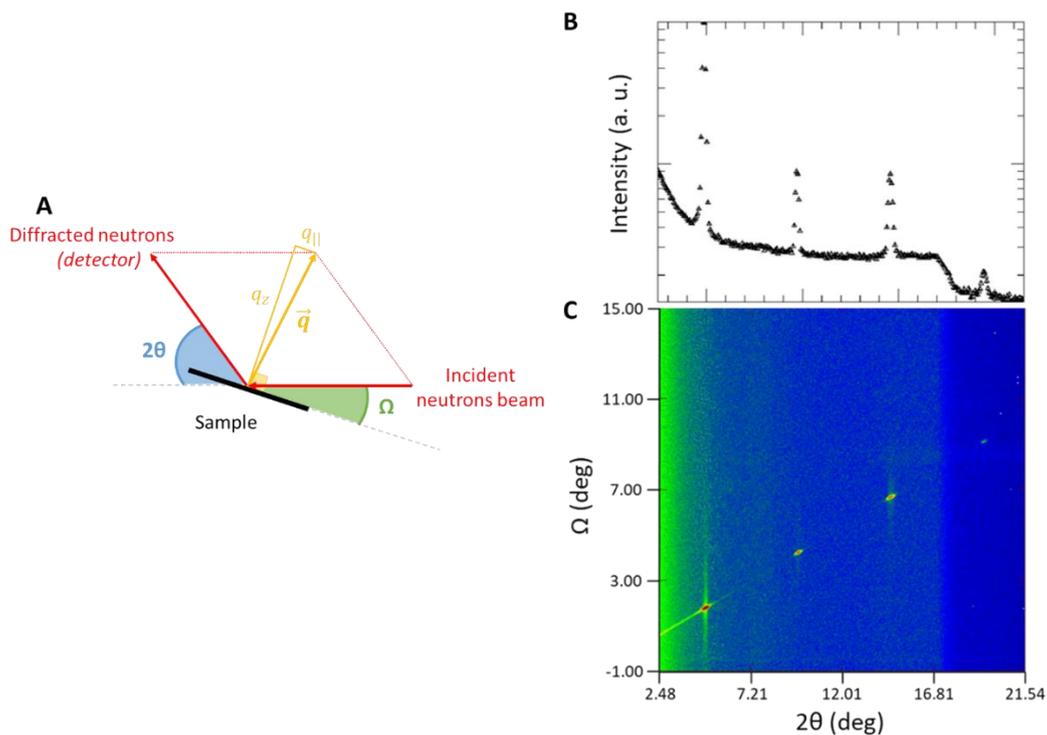


Figure S1. (A). Scattering geometry in top-view. The incident beam (red) illuminates the sample (black) with an adjustable angle of incidence Ω (green). For each Ω , the 2θ -dependent (blue) intensity is recorded by the detector. The angles 2θ and Ω are associated with the reciprocal space coordinates q_z and $q_{||}$ (yellow). (B) 1D-map of the intensity integrated along Ω showing the Bragg peak positions. (C) Typical diffraction scan $I(2\theta, \Omega)$ showing the Bragg peak positions.

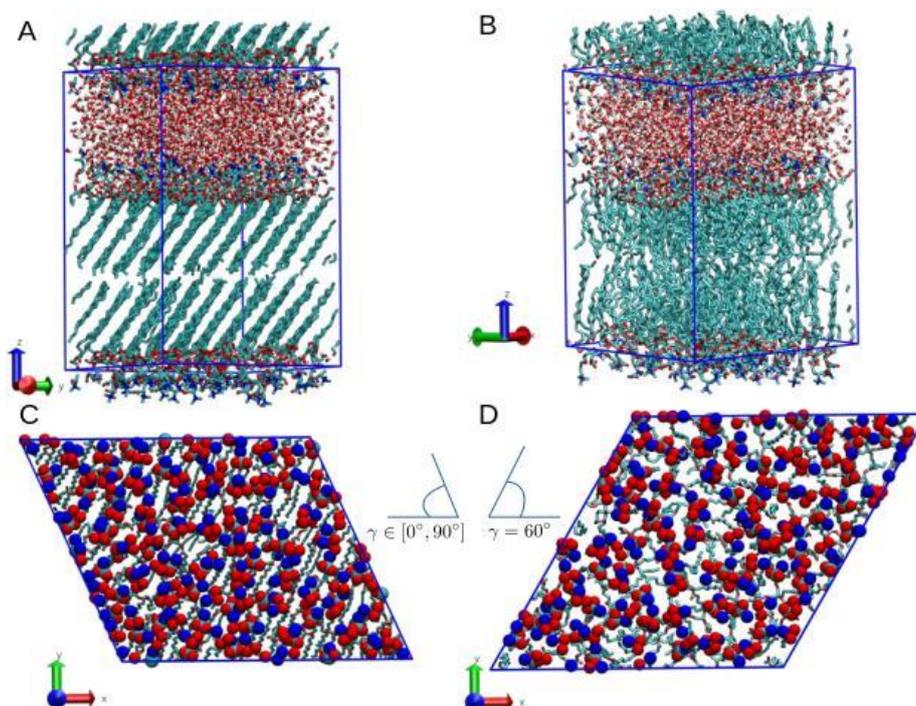


Figure S2: A,B. Snapshots of the simulations in the L_β (gel) and L_α (fluid) phases, respectively. Blue lines show the periodic simulation box. C. Top-view of a simulation in the gel phase where the head-group atoms are highlighted using spheres. The tilt angle is free to adjust according to the lipid lattice structure with a typical value of $\gamma \sim 60^\circ$. D. For the simulations in the fluid phase the tilt angle is fixed at $\gamma = 60^\circ$. Note that $\gamma \in [0^\circ, 90^\circ]$ due to the minimum image convention in the periodic boundary conditions employed, i.e. the box angle in C is allowed to flip its direction.

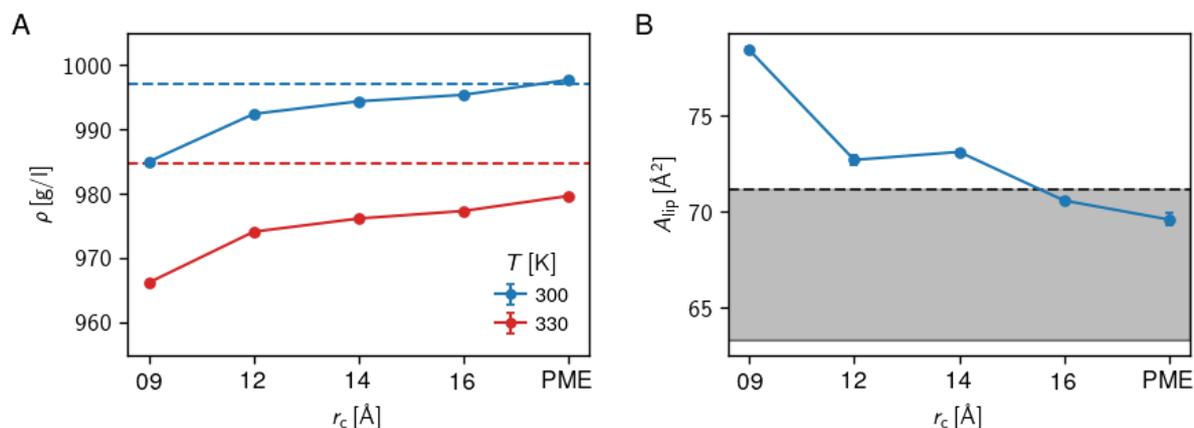


Figure S3: **A.** Influence of the Lennard-Jones cutoff on the bulk water density at 300 K and at 330 K. Horizontal dashed lines denote the experimental values (Lide, 2005) **B.** Area per lipid in a DPPC membrane for the different treatment of the Lennard Jones interactions. The gray are denotes the typical values obtained experimentally; the dashed line is obtained by Lis et al. (Lis et al, 1982), solid line by Petrache et al. (Petrache et al, 2000).

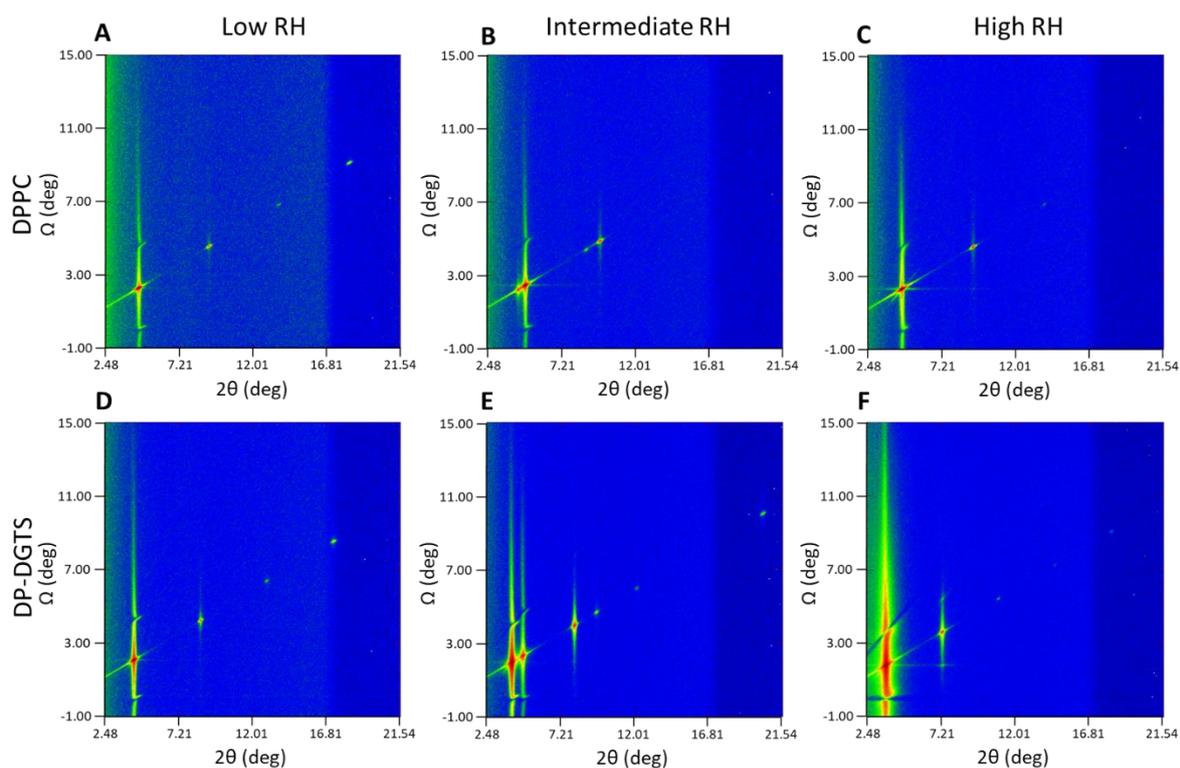


Figure S4. Diffraction scan $I(2\theta, \Omega)$ showing the Bragg peak positions of DPPC (**A-C**) and DP-DGTS (**D-F**) at three different humidities: low (**A** and **D**) intermediate (**B** and **E**) and high (**C** and **F**). The measurements were done at 50 °C. Relative humidity values: DPPC 30.3, 85.0, 95.8%. DP-DGTS 32.2, 87.2, 97.9%. Solvent composition 100% D₂O.

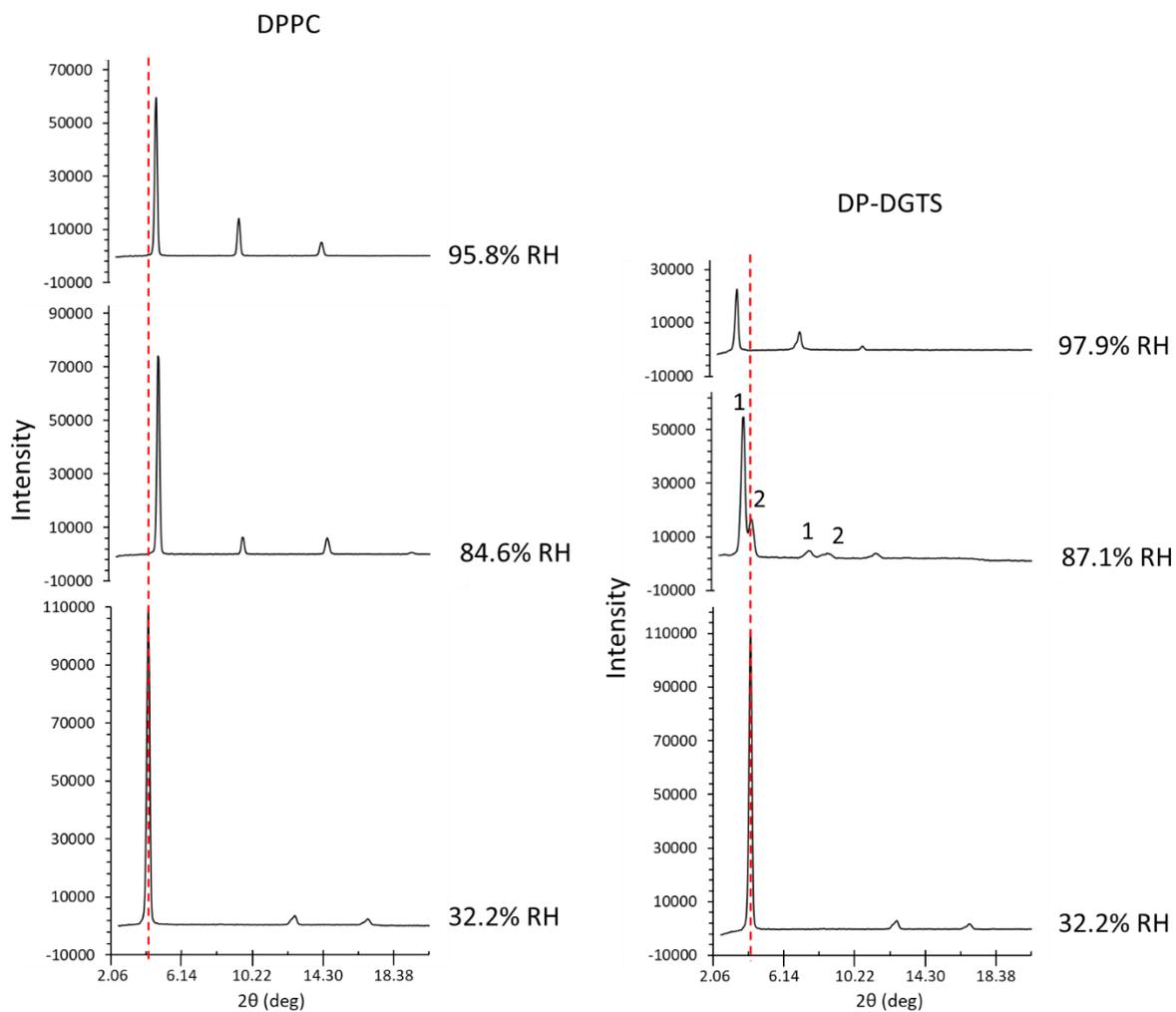


Figure S5. Intensity of the Bragg peaks at the 3 humidities. The gel and fluid phases in the DP-DGTS sample at RH = 87.1% are noted with 1 and 2. Phase 1 is probably in the gel state and phase 2 the fluid one. The temperature of the sample was 50 °C.

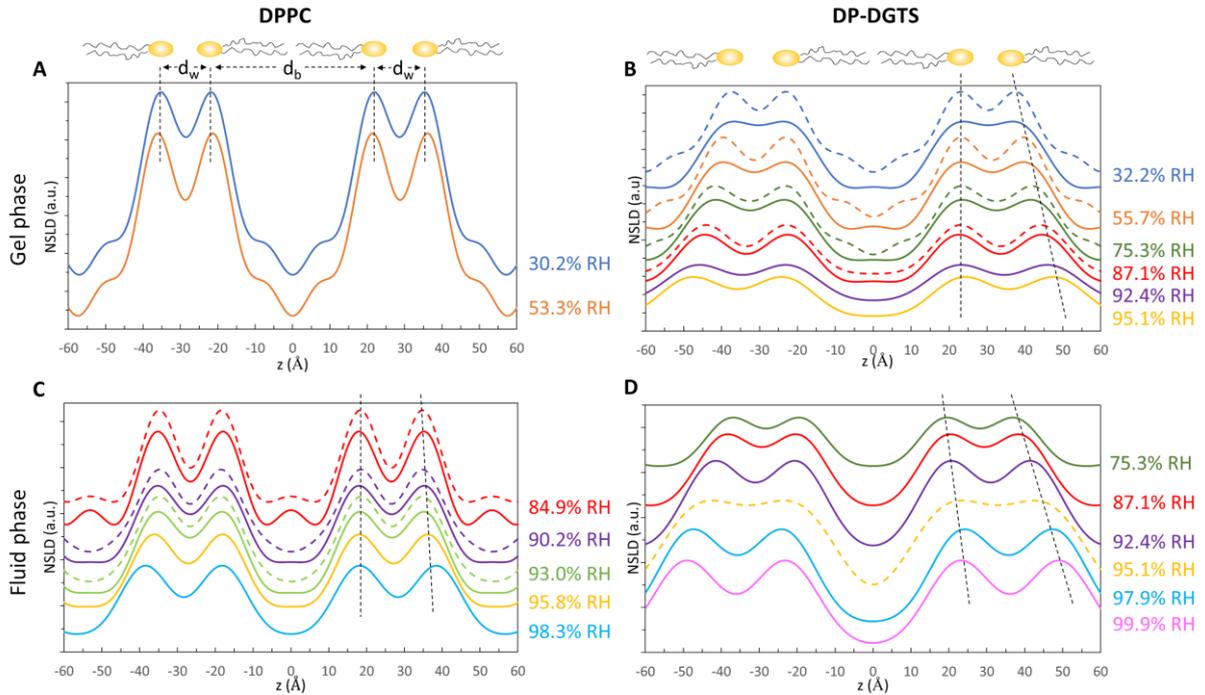


Figure S6. Neutron Scattering Length Density (NSLD) of DPPC (A and C) and DP-DGTS (B and D) measured at 50 °C as described in material and method. The gel and fluid phase are separated in two graphs for the two lipids, A and B for the gel phase, C and D for the fluid phase. The bilayer thickness d_b corresponds to the center-to-center distance between headgroups as described in (Nagle & Tristram-Nagle, 2000) and the water layer thickness d_w corresponds to $d-d_b$, with d being the lamellar repeat distance or d -spacing and d_b the bilayer thickness. These are represented in panel A. The solid lines are the NSLD profile calculated using the minimum of three Bragg peaks and the dash lines are calculated using 4 or 5 peaks when visible at the highest humidities for DP-DGTS. The dotted black lines show the shift upon hydration of the maxima in the NSLD profile, showing the increase of the water layer thickness.

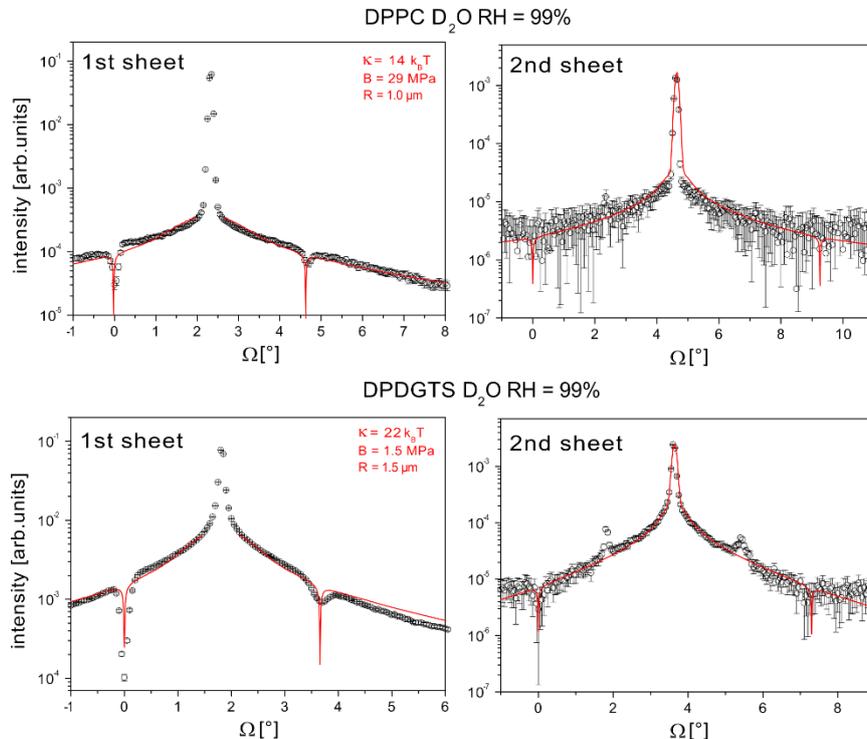


Figure S7. Intensities of the first (left) and second (right) Bragg sheets of DPPC membranes (top) and DP-DGTS membranes (bottom) at RH = 99%. In red, the best-matching model parameters for both systems are summarized with the empirical cut-off parameter termed R and the mechanical parameters κ and B derived thereof according to Eqs.10 and 11 as described in the material and method section (Schneck et al, 2011).

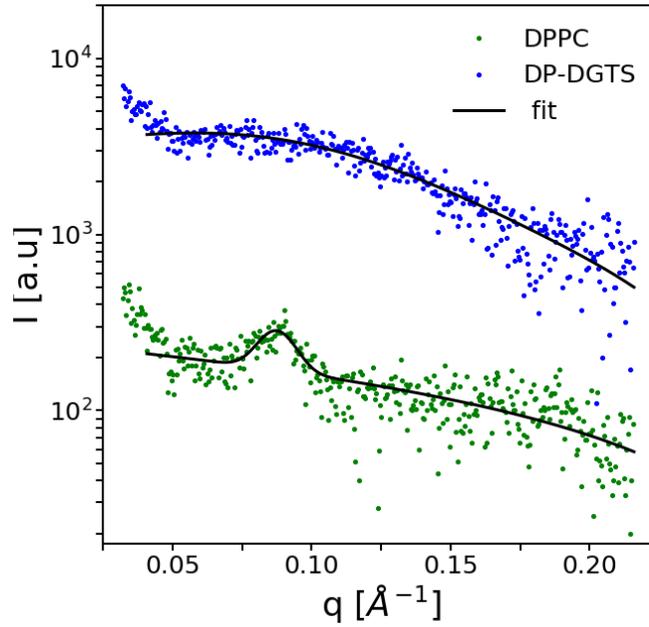


Figure S8. SAXS scattering curves of multilamellar vesicles made of DP-DGTS (blue symbols, scaled by 10) and DPPC lipids (green symbols) at $T = 20\text{ °C}$. Black lines are the best fit obtained.

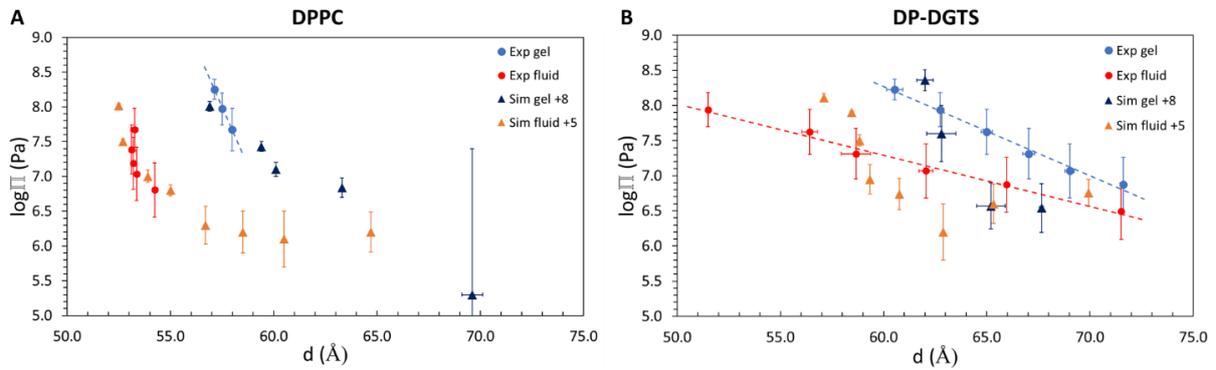


Figure S9. Simulated lamellar period of DPPC (A) and DP-DGTS (B) bilayer stacks as a function of the humidity, measured at 50 °C (circle) or computed (triangle). Simulated repeated distance are shifted in the gel phase by 8 Å and in the fluid phase by 5 Å , due to the simplification of the fatty acid tail, especially considering the interaction between the terminus of two tails.

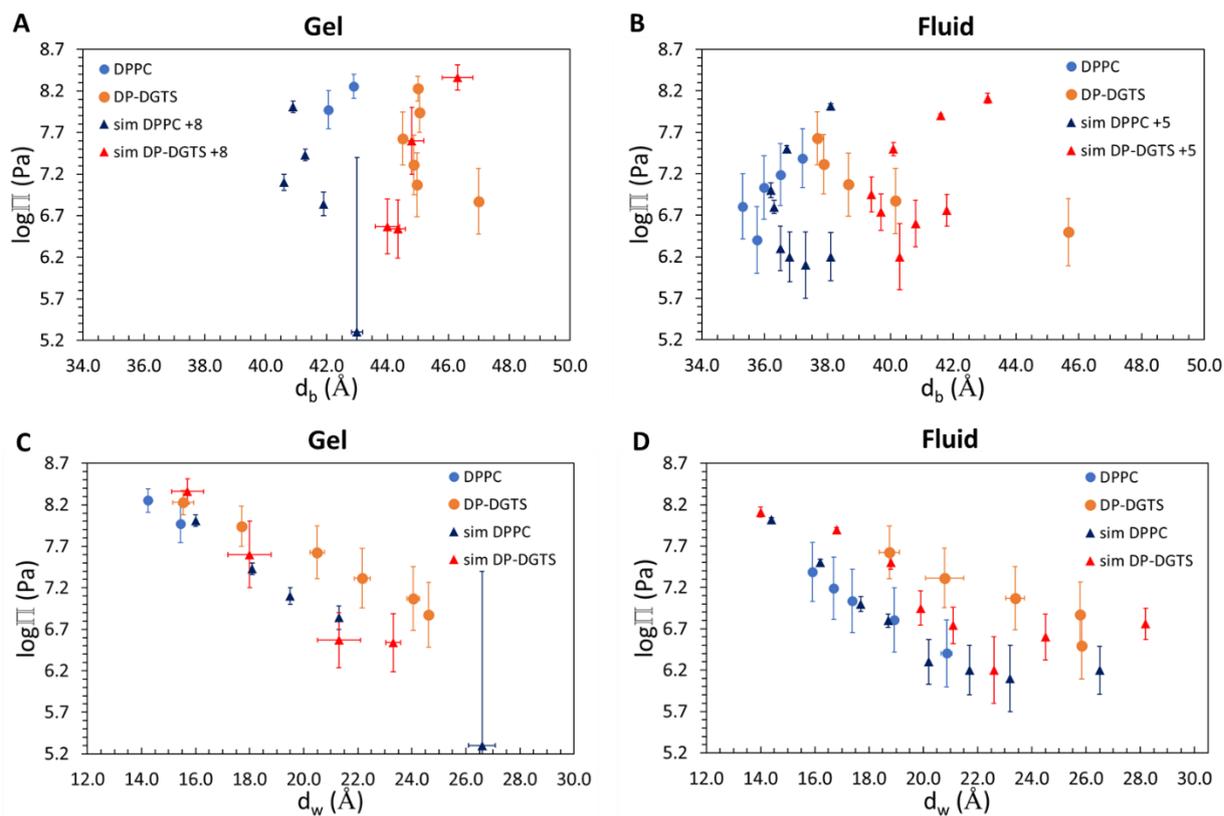


Figure S10. Comparison of the bilayer thickness (**A** and **B**) and of the water layer thickness (**C** and **D**) as a function of the hydration pressure obtained by simulation (triangles) or by experiment (circles) in the gel phase (**A** and **C**) and in the fluid phase (**B** and **D**). For the bilayer thickness, in the gel phase the simulation results are shifted by 8 Å and in the fluid phase by 5 Å, due to the simplification of the fatty acid tail, especially considering the interaction between the terminus of two tails.

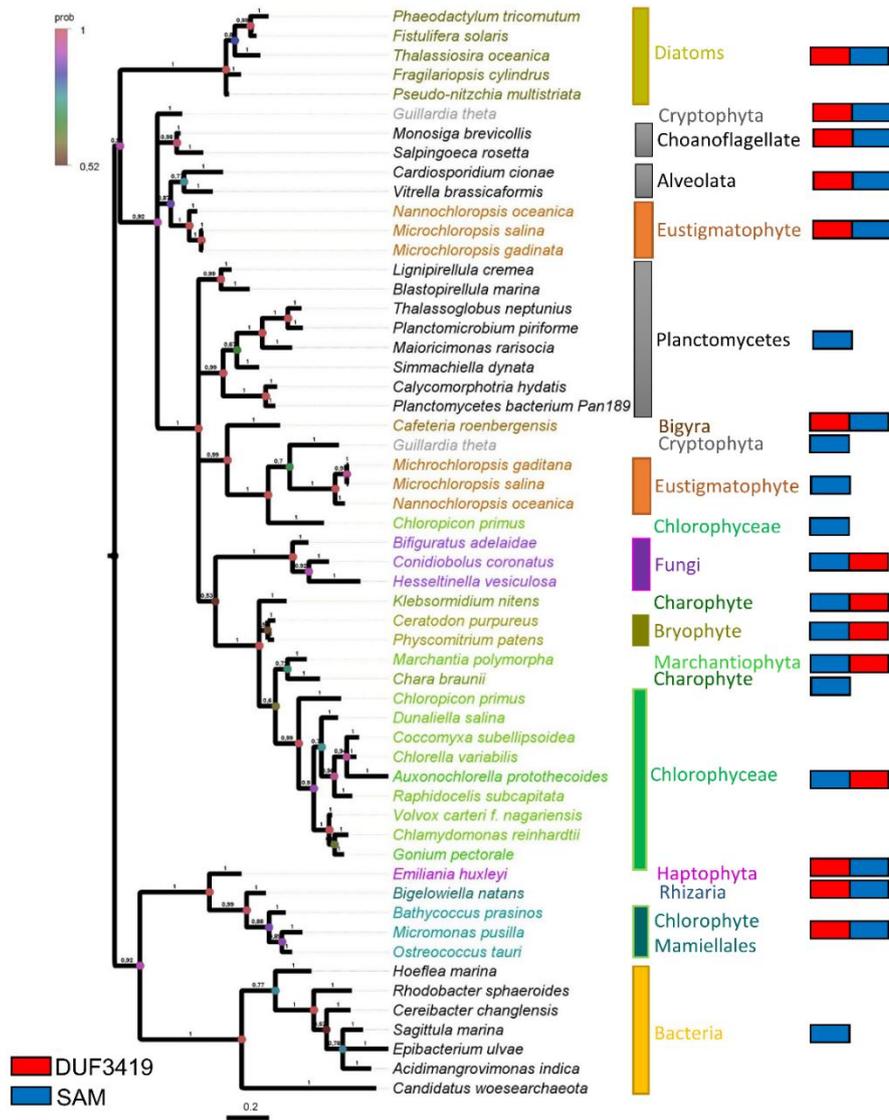


Figure S11. Bayesian phylogenetic tree of the S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase domain of the BTA1 protein. Bayesian Posterior Probability values are reported next to the branches. The color of the node circles represents BPP. Color code is reported on the figure. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. On the right-hand side the configuration of the protein is reported; **red**: 3-amino-3-carboxypropyl-transferase domain (Domain of Unknown Function DUF3419); **blue**: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase (SAM).

4 Conclusion

Ce chapitre constitue une première étude des phases formées par les bétaines lipides. Initialement, le but de ce projet était de vérifier si l'architecture d'une membrane de bétaine lipide était identique à celle d'une membrane de PC. En effet, les deux lipides étant liés par leurs structures très proches, et également par leur interchangeabilité en carence de phosphate, l'hypothèse semblait simple. Pourtant les premières expériences sur les lipides naturels extraits des microalgues ont révélé des résultats étonnants et difficiles à interpréter à cause des différences trop variables entre les lipides étudiés (changement de tête polaire, diversité des acides gras). Il était donc impossible de conclure sur les observations faites. Les lipides ont donc été simplifiés et l'étude des membranes de DPPC et de DP-DGTS a permis de montrer que la tête polaire, à elle seule, joue un rôle important sur le comportement des membranes vis-à-vis de l'hydratation. Ainsi, nous avons montré avec cette étude que le remplacement de la PC par le DGTS en carence de phosphate chez *Microchloropsis gaditana* n'est pas un remplacement entre deux lipides dont les propriétés sont identiques.

Nous avons montré avec cette étude que les bicouches de DP-DGTS étaient plus épaisses et plus sensibles à l'hydratation, avec d'une part, l'incorporation d'eau dans la bicouche et d'autre part, une orientation de la tête polaire différente, impactant les forces électrostatiques répulsives des membranes. Même si les bétaines lipides et la PC sont des lipides zwitterioniques, la répartition des charges portées par chaque groupement est différente (Figure 33). Les résultats de dynamique moléculaire montrent que la tête polaire du DGTS est plus étroite que celle de la PC. Cela pourrait donc expliquer la présence de la phase HII dans le DGTS naturel riche en double 20:5. Cependant, la simulation par dynamique moléculaire ne reproduit pas intégralement nos résultats expérimentaux, ne nous permettant pas de comprendre tous les mécanismes sous-jacents à ces propriétés observées.

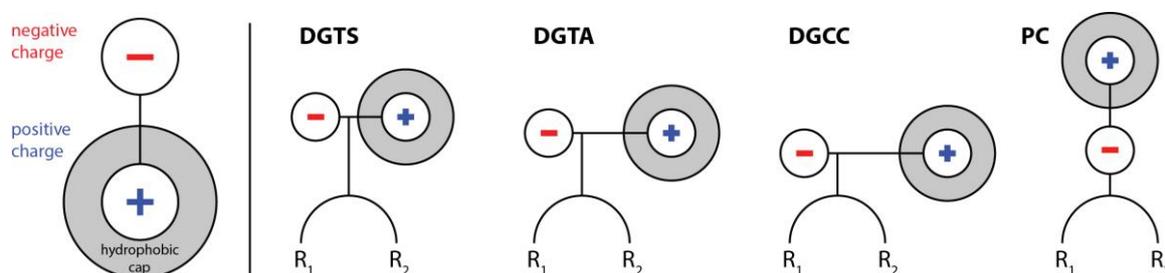


Figure 33. Représentation schématique du dipôle de la tête polaire des bétaines lipides (DGTS, DGTA et DGCC) et de la PC. La charge positive portée par l'ammonium est masquée par les trois groupements méthyls (*hydrophobic cap*). La charge négative est portée par le phosphate pour la PC et par le groupement carboxyl pour les bétaines lipides. Le dipôle étant plus étroit pour le DGTS que pour la PC, ce pourrait impliquer des répulsions électrostatiques plus fortes entre les membranes.

Pour poursuivre cette étude, il serait intéressant d'obtenir du DP-DGTA par synthèse chimique par exemple, pour continuer d'observer le rôle de la modification de la tête polaire sur l'architecture des membranes et pouvoir mesurer l'influence de la longueur du dipôle. De plus, DGTS et DGTA étant des isomères structuraux, il serait intéressant de pouvoir les comparer. Pour savoir si les acides gras ont également un rôle à jouer dans les structures observées dans l'étude préliminaire, une comparaison entre un DGTS avec des courtes chaînes d'acides gras pourrait être faite avec un DGTS 20:5/20:5. Avec un contraste à 8 % D₂O, l'épaisseur de la bicouche pourra également être suivie. Ensuite, pour poursuivre l'étude du DGTS sur un axe évolutif, un projet de thèse a débuté où il s'agit d'apporter une preuve que le DGTS a un effet délétère sur les plantes supérieures du fait de ces propriétés. En effet, les expériences menées en interne au laboratoire LPCV montrent que la production de DGTS chez *Nicotiana benthamiana* est possible en produisant une DGTS synthase sous le contrôle du promoteur 35S, mais jusqu'à présent il est impossible d'obtenir des graines. Pour cela, le gène de synthèse du DGTS sera placé sous le contrôle d'un promoteur inductible et transformé chez *Arabidopsis thaliana*. L'effet de la présence du DGTS sera suivi à plusieurs temps de la vie de la plante jusqu'à la formation des graines. En parallèle, le gène de synthèse du DGTS, et du DGTA sera supprimé chez *Microchloropsis gaditana* et *Phaeodactylum tricornutum* respectivement, ainsi que celui de la synthèse de la PC (PEAMT). L'impact sur les microalgues placées en carence de phosphate sera observé par la croissance, la composition en lipide et l'architecture des membranes par microscopie.

Chapitre 2 :

Etudes des lipides exotiques dans les membranes des microalgues

1 Préambule

Chez les microalgues, les analyses de la composition lipidique totale révèlent la présence de lipides particuliers, qui ne sont pas retrouvés chez les plantes. Par exemple, dans le chapitre précédent, la présence des bêtaines lipides a été notée chez les microalgues (Sato, 1992), et une étude plus spécifique du rôle du DGTS dans l'architecture de la membrane dans une cellule en carence de phosphate a été réalisée.

Comme montré dans la partie bibliographique, par rapport aux plantes supérieures, dont les lipides membranaires sont riches en acides gras en C16 et C18, les membranes des microalgues sont souvent composés de lipides portant des acides gras à très longues chaînes polyinsaturées, aussi appelés VLC-PUFA (*Very Long Chain Poly-Unsaturated Fatty Acids*) (Abida et al., 2015; Jouhet et al., 2017). Par exemple, la présence de l'EPA 20:5 (acide eicosapentaénoïque) et du DHA 22:6 (acide docosahexaénoïque), des acides gras très intéressants pour le développement des fonctions cognitives humaines, est détectée. Chez les microalgues, la majorité des glycérolipides possèdent au moins un acide gras 20:5, positionné en *sn-1* du motif glycérol (Abida et al., 2015; Jouhet et al., 2017). Chez la diatomée *Pheodactylum tricornutum*, le double 20:5 se trouve dans la PC (Figure 34), la PE et un peu dans le DGTA (Abida et al., 2015), et chez l'eustigmatophyte *Microchloropsis gaditana*, ce double acide gras peut être retrouvé dans le MGDG (Jouhet et al., 2017). Mais en terme de proportion, les lipides 20:5/20:5 ne sont pas majoritaires et constituent une petite partie des lipides membranaires, servant probablement à augmenter la fluidité membranaire ou la courbure de membrane à des endroits spécifiques.

En effet, les acides gras à très longue chaîne favorisent la fluidité de membrane (Maulucci et al., 2016; Takamori et al., 2006; Yang et al., 2012), réduisent la taille des membranes (Fernandes et al., 2002) et favorisent la courbure de membrane (Pinot et al., 2014; Risselada and Marrink, 2009). Ensuite, dans leur étude, Nagatome et Yoshimoto comparent la perméabilité des vésicules formées de PC 18:1/18:1, PC 18:2/18:2 et PC 18:3/18:3, et concluent que les insaturations augmentent la perméabilité membranaire (Nagatomo and Yoshimoto, 2019). Enfin, pour rappel, la température de transition de phase entre la phase gel et la phase fluide augmente avec la longueur de la chaîne carbonée, mais diminue avec le nombre d'insaturations (Koynova and Tenchov, 2008). Alors que la température de transition de phase de la DPPC (PC 16:0/16:0) est mesurée à 41°C, celle de la PC 20:4/20:4 est mesurée à -69°C (données Avanti®). La température de transition de phase de la PC 22:6/22:6 a été déterminée à -68,4°C (Avanti®, Kariel et al., 1991). En revanche, les propriétés biophysiques de ces VLC-PUFA vis-à-vis de l'hydratation n'ont pas été étudiées. Dans ce projet, nous avons voulu comprendre comment les acides gras à très longues chaînes, donc très hydrophobes,

s'organisent en présence d'eau, et si des structures spécifiques de membrane apparaissaient. En effet, du fait de l'encombrement des acides gras par rapport à la tête polaire, il serait envisageable que les lipides à longues chaînes de carbone aient une organisation hexagonale. Pour ce faire, la PC 20:5/20:5 n'étant pas commercialisée, l'étude de ce projet a été réalisée sur une membrane composée uniquement d'un seul lipide PC portant deux acides gras 22:6, comme substitut à son homologue 20:5/20:5 présent dans la composition des microalgues (*Figure 34*).

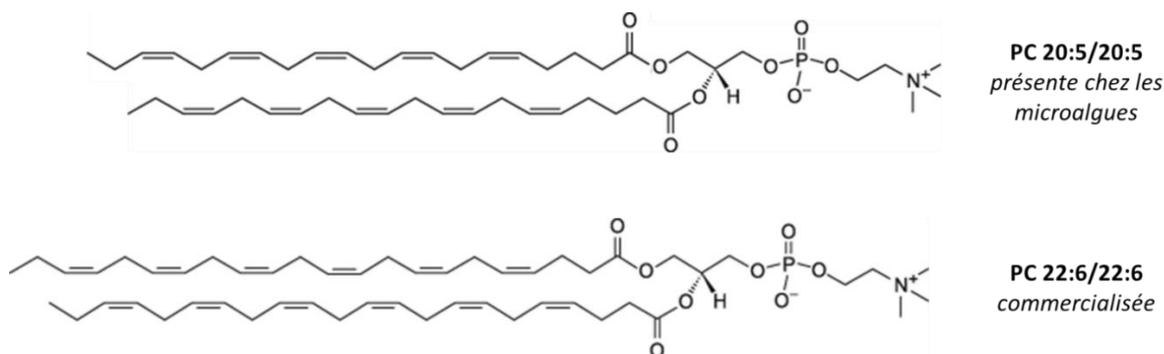


Figure 34. Structures schématiques de la PC 20:5/20:5 présente dans les membranes des microalgues et de la PC 22:6/22:6 commercialisée chez Avanti®, utilisée dans ce projet. Toutes les insaturations sont en *cis*, mais ici l'angle n'est pas respecté. **PC** : phosphatidylcholine.

Chez certaines microalgues, un autre lipide particulier, un sulfolipide acylé nommé ASQD (acyl-sulfoquinovosyldiacylglycérol), est retrouvé en très faible quantité, comme par exemple chez *Phaeodactylum tricornutum*, (< 0,1 nmol de lipides pour 10⁶ cellules) (Abida et al., 2015), ou *Chlamydomonas reinhardtii* (estimée à moins de 1 % (m/v)) (Riekhof et al., 2003). En revanche, ce lipide n'est pas présent chez *Microchloropsis gaditana*. La structure d'ASQD de *Phaeodactylum tricornutum* a été étudiée par spectrométrie de masse (Naumann et al., 2011), permettant de déterminer que le squelette de base est un SQDG, mais présente un troisième acide gras estérifié sur le deuxième carbone du groupement quinosove (*Figure 35*). Ce troisième acide gras est généralement le plus long et le plus insaturé acide gras trouvé chez l'organisme étudié, 20:5 chez *Phaeodactylum tricornutum*, et 18:4 chez *Chlamydomonas reinhardtii*. La synthèse et la localisation de ce lipide ne sont également pas connues. Par hypothèse, du fait de sa structure, la synthèse pourrait être réalisée à partir du SQDG par estérification de l'acide gras supplémentaire. En effet, le mutant de l'enzyme de synthèse du SQDG, *sqd1*, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, conduit à l'absence du SQDG et de l'ASQD dans les membranes (Riekhof et al., 2003). Sa localisation pourrait être supposée également dans les membranes du chloroplaste, tout comme le SQDG dans des conditions normales de culture.

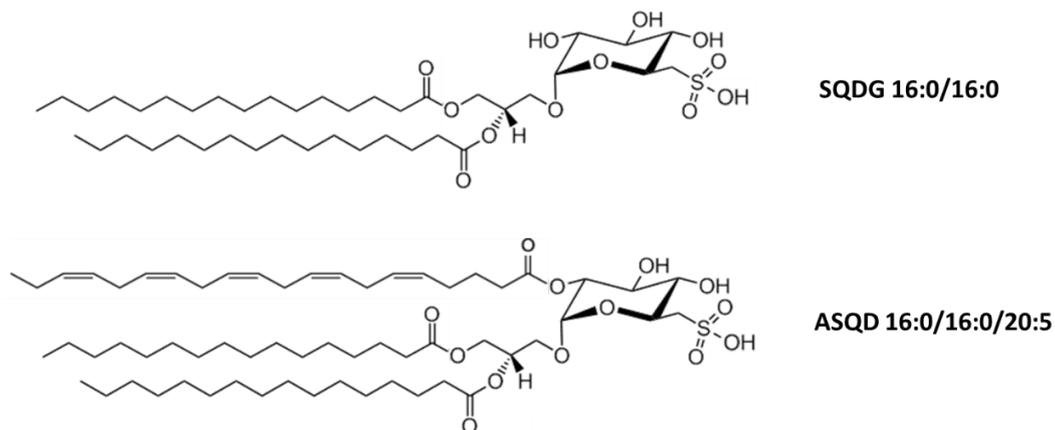
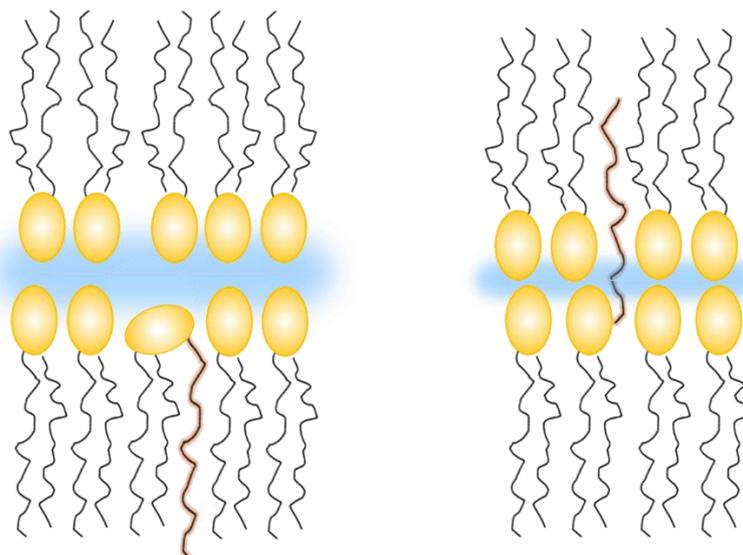


Figure 35. Structures schématiques du SQDG et de l'ASQD. Les deux lipides ont une structure similaire, mais l'ASQD possède un acide gras supplémentaire estérifié sur le carbone 2 du groupement sulfoquinovose. Le troisième acide gras de l'ASQD est le plus long et le plus insaturé acide gras de l'organisme, ici 20:5 chez *Phaeodactylum tricornutum*. Toutes les insaturations sont en *cis*, mais ici, l'angle n'est pas respecté. **SQDG** : sulfoquinovosyldiacylglycérol, **ASQD** : acyl-sulfoquinovosyldiacylglycérol.

Ce lipide a suscité des interrogations quant à sa structure et son rôle dans la membrane. Aucune étude n'a été menée sur la conformation de ce lipide dans la membrane, en particulier sur celle du troisième acide gras. Dans ce projet, nous avons proposé deux hypothèses : (1) le troisième acide gras se situe dans la même membrane que les deux autres, ce qui pourrait rapprocher la tête polaire de la membrane et donc réduire les forces de répulsion entre deux bicouches, ou bien (2) le troisième acide gras s'ancre dans une membrane adjacente, ce qui rapproche les deux membranes par effet de pontage, pouvant donc favoriser des échanges entre deux organites par exemple. Ces deux hypothèses sont illustrées sous forme de schémas simplifiés en Figure 36. C'est la configuration de cet acide gras particulier que nous avons essayé de découvrir en utilisant la diffraction de neutrons sur des membranes reconstituées.



Hypothèse 1 : le troisième acide gras se situe dans la même membrane que les deux autres, rapprochant la tête polaire de la membrane.

Hypothèse 2 : le troisième acide gras est ancré dans la membrane adjacente, rapprochant les deux membranes par effet de pontage.

Figure 36. Schémas simplifiés des deux hypothèses de conformation du troisième acide gras (**en orange**) estérifié sur la tête polaire d'ASQD. Les repliements possibles des acides gras ne sont pas pris en compte dans ce schéma. En **bleu**, la couche d'eau séparant les deux membranes.

2 Etude de l'organisation de la PC 22:6/22:6 par diffraction de neutrons

DOI expérience : 10.5291/ILL-DATA.8-02-820

Les données numériques sont présentées en Annexes de ce manuscrit

Pour comprendre l'organisation des acides gras à très longues chaînes dans une membrane, et comprendre leur comportement vis-à-vis de l'hydratation, la diffraction de neutrons a été utilisée sur un film composé d'un seul lipide, la PC 22:6/22:6 (*Figure 34*), commandée chez Avanti® Polar Lipids, la PC 20:5/20:5 n'étant pas commercialisée.

Les lipides sont déposés sur wafer de silicium selon la méthode décrite dans la partie matériel et méthode de ce rapport (section 5.2.1). Initialement, 500 µg ont été déposés sur le wafer, mais aucune diffraction n'était visible. La teneur en lipides a donc été augmentée pour déposer 5 mg sur le wafer. Ce dernier est ensuite placé et aligné dans la chambre d'humidité de l'instrument D16. L'échantillon est maintenu à 25°C, température suffisante pour que les acides gras soient en phase fluide (température de transition déterminée à -68,4°C (Avanti®, Kariel et al., 1991)). Le solvant de contraste 100 % D₂O a été utilisé pour cette étude. L'humidité relative à l'intérieur de la chambre a été

fixée à 30 % d'humidité avant d'être augmentée progressivement. Entre chaque humidité, un temps d'équilibre a été respecté pour mesurer le système à l'équilibre.

2.1 Résultats

A faible hydratation, un seul pic de Bragg est bien visible sur le scan $I(2\theta_x, \Omega)$ (Figure 37.A). Cela signifie que l'échantillon est peu ordonné, malgré la finesse du pic de Bragg. L'ordre ne se propageant pas au-delà de la corrélation entre les premiers voisins, il est impossible de savoir s'il s'agit d'un ordre lamellaire, micellaire ou d'une autre construction. En effet, un minimum de deux voire trois ordres est nécessaire pour déterminer l'organisation d'une membrane. Ensuite, avec l'augmentation de l'humidité, le signal du pic de Bragg devient de moins en moins intense (Figure 37.B et C), avant de disparaître complètement dès $RH = 86,2\%$ (Figure 37.D). L'expérience a donc été interrompue à cette humidité.

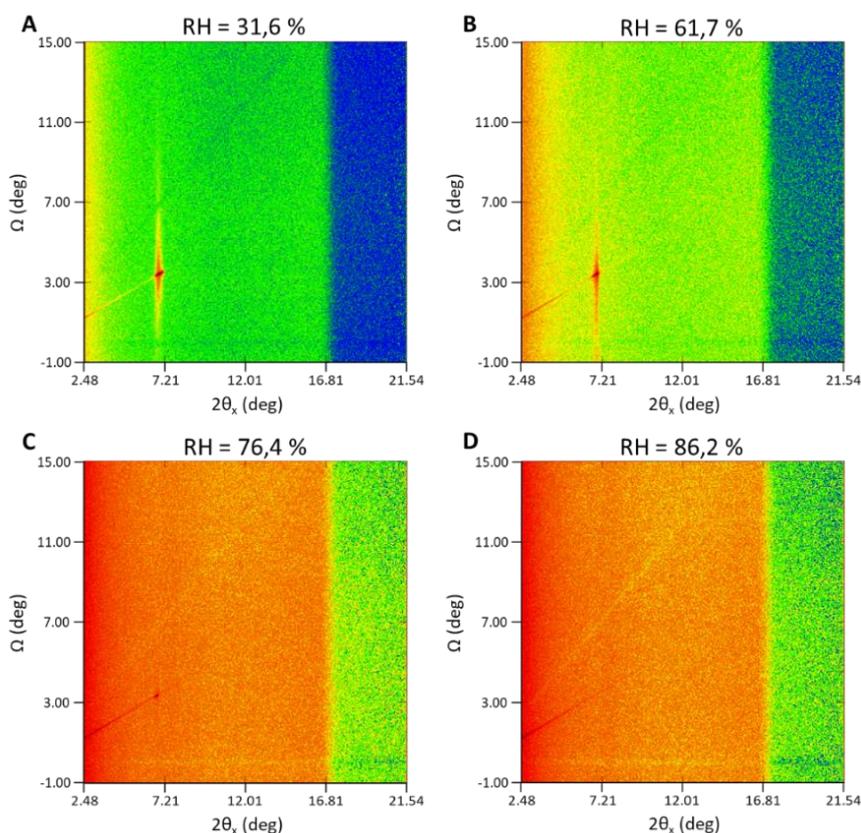


Figure 37. Scans de diffraction $I(2\theta_x, \Omega)$ de la PC 22:6/22:6 à différentes humidités relatives. Les mesures ont été faites à un contraste de solvant à 100 % D_2O , et l'échantillon est maintenu à 25°C. Un seul pic de Bragg est visible aux trois premières humidités, mais dont l'intensité diminue avant de disparaître à $RH = 86,2\%$.

Il est tout de même possible de calculer théoriquement la période associée à cette membrane en la supposant lamellaire. En calculant un deuxième et un troisième ordre positionnés à un angle $n \times \theta_b$, n étant l'ordre du pic et θ_b le demi angle de diffraction du premier pic de Bragg, il est possible de déterminer la valeur de la période par régression linéaire des points (Figure 38). Ainsi, l'observation serait que la périodicité n'est pas impactée par l'hydratation sur cette gamme de trois faibles humidités. Entre RH = 61,7 % et RH = 76,4 %, la période n'augmente que de 1 Å ce qui n'est pas significatif pour une membrane de lipide. La période moyenne théorique est donc calculée à 37,9 Å. S'agissant de calculs théoriques sur les valeurs de d , il est impossible d'obtenir d'erreur associée.

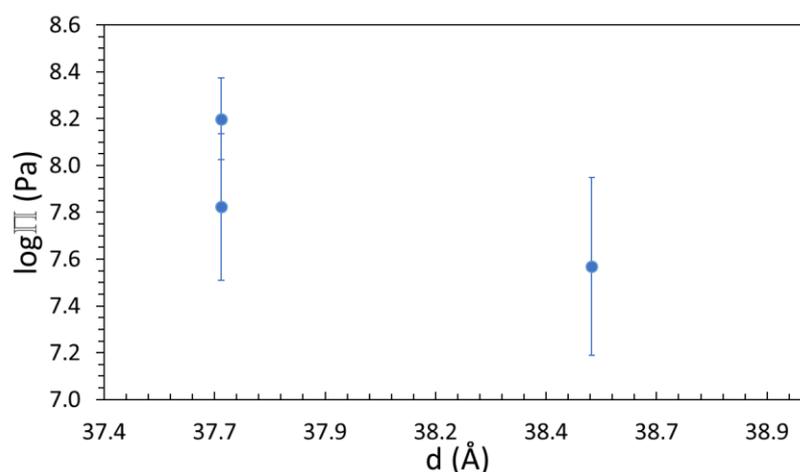


Figure 38. Période théorique d'une membrane de PC 22:6/22:6 supposée lamellaire à faible humidité. Avec l'augmentation de l'humidité, la membrane semble avoir une périodicité identique d'environ 37,9 Å en moyenne. Les calculs de d étant théoriques, l'erreur associée ne peut pas être calculée.

2.2 Discussion et perspectives

Il ressort de cette étude que la PC 22:6/22:6 n'est pas capable de s'organiser seule en motifs répétés, telle la bicouche ou la phase hexagonale inverse. Une première hypothèse serait que, du fait de l'encombrement des acides gras très longs et polyinsaturés, ce lipide puisse former des vésicules de tailles diverses (Manni et al., 2018). Avec l'augmentation de l'hydratation, ces vésicules ont pu se déstructurer, rendant impossible la diffraction des neutrons sur un échantillon non structuré. Une autre hypothèse serait la présence d'un mélange de lipides organisés en phase lamellaire, dont le signal est visible, mais masqués dans des lipides en phase amorphe, sans organisation particulière, comme au cœur d'une gouttelette lipidique (Mahamid et al., 2019). Avec l'hydratation, tous les lipides semblent être en phase amorphe, d'où la perte de signal progressive. A la fin de l'expérience, en sortant l'échantillon de la chambre BerILL, une odeur de poisson, caractéristique de la dégradation des acides gras en composés volatils, s'est fait sentir. La perte du signal de diffraction pourrait donc être liée à la dégradation des acides gras, et donc la perte de structure du film de lipides.

Pour comprendre le rôle de ces lipides à longues chaînes polyinsaturées, une autre stratégie pourrait être de mélanger dans une membrane connue de PC 18:3/18:3, par exemple, une quantité croissante de PC 22:6/22:6. En effet, la PC 18:3/18:3 est commercialisée (Avanti®), sa température de transition de phase est mesurée à -60°C (Avanti®, (Patrick Williams et al., 1996)), donc également en phase fluide à 25°C, adopte une organisation lamellaire, dont l'épaisseur de la bicouche est mesurée à 55,6 Å et 49,8 Å, respectivement en phase gel et en phase fluide (Patrick Williams et al., 1996). Ainsi, la structure de la membrane initialement lamellaire de la PC 18:3/18:3 pourrait ou non changer d'organisation et d'épaisseur avec l'ajout progressif de PC 22:6/22:6. En conservant une tête polaire identique pour les deux lipides, la répulsion des membranes apportées par les charges et/ou l'encombrement stérique de la tête polaire est identique, permettant de ne comparer que l'impact des acides gras et de leur conformation dans la structure de la membrane.

Si la PC 22:6/22:6 favorise la courbure de la membrane, le résultat attendu serait donc l'apparition de motifs hexagonaux au fur et à mesure de l'augmentation de PC 22:6/22:6 dans la membrane de PC 18:3/18:3. Une coexistence de phase lamellaire et de phase hexagonale peut donc être visible aux faibles concentrations de PC 22:6/22:6, avant de dépasser cet équilibre entre les deux phases pour atteindre un état stationnaire composé uniquement de phase hexagonale à forte concentration de PC 22:6/22:6. La force de compression et la courbure de la membrane, sans et avec PC 22:6/22:6, sont deux paramètres pouvant également être calculés pour renseigner sur la rigidité de la membrane étudiée et ainsi en déduire les propriétés du lipide connaissant celles de la PC 18:3/18:3. Mais ce calcul se fait à partir de la diffusion spectrale sur le deuxième ordre de diffraction, donc nécessite un minimum d'organisation au sein de la membrane, ce qui n'est pas le cas ici dans une membrane composée à 100 % par de la PC 22:6/22:6.

Cette étude complémentaire pourrait donc permettre de déduire les propriétés et le rôle de la PC 20:5/20:5 présente dans les membranes de *Phaeodactylum tricornutum* à une teneur d'environ 20 % des espèces de lipides de la PC, 24 % pour la PE et 11 % pour le DGTA (Abida et al., 2015).

3 Etude de l'organisation de l'ASQD de *Phaeodactylum tricornutum*

DOI expérience 100 % D₂O : 10.5291/ILL-DATA.8-02-878

DOI expérience 8 % D₂O : 10.5291/ILL-DATA.TEST-3119

Les données numériques sont présentées en Annexes de ce manuscrit

Cette étude a pour but d'apporter des éléments de réponse en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses proposées concernant la conformation d'ASQD dans la membrane, et en particulier celle du troisième acide gras estérifié sur la tête polaire (*Figure 36*). Pour cela, des membranes biomimétiques sont formées et diffractées par neutrons. La purification des chloroplastes des microalgues n'étant pas encore mise au point, une estimation de la composition en lipides des thylakoïdes (membranes photosynthétiques) de *Phaeodactylum tricornutum* a été faite. En effet, tous les organismes photosynthétiques, des cyanobactéries jusqu'aux plantes supérieures en passant par les algues, possèdent les quatre lipides MGDG, DGDG, SQDG et de PG (Boudière et al., 2014). Chez les plantes, cultivées dans des conditions standards, non carencé en phosphate, les glycolipides sont très majoritairement localisés dans le chloroplaste, dont la purification est possible (Block et al., 1984). Seul le PG peut aussi être distribué dans d'autres membranes, comme celles des mitochondries par exemple. Par analogie, il a été supposé que ces lipides n'étaient pas présents dans les membranes extraplastidiales, ou en quantité négligeable et que les quantités mesurées de MGDG, DGDG, SQDG, PG et ASQD provenaient en totalité du chloroplaste, sans distinction des différentes membranes. Chez les plantes et les algues, les thylakoïdes représentant plus de 90 % des membranes du chloroplaste, en utilisant les quantifications déterminées par (Abida et al., 2015), et en mettant la quantité du lipide majoritaire, ici le MGDG, à 100 mol, les proportions des autres lipides peuvent être calculées pour refléter la composition d'une membrane de thylakoïde.

Trois membranes biomimétiques ont été réalisées à partir des lipides naturels extraits de *Phaeodactylum tricornutum*. Dans ces membranes, la quantité d'ASQD est progressivement augmentée alors que les autres lipides gardent une proportion similaire (*Table 9*), ce qui, de manière globale, augmente la proportion de lipides chargés négativement (*Figure 39*). La membrane « 4 ASQD » correspond aux proportions naturelles. Les deux autres compositions correspondent à une membrane sans ASQD (0 ASQD), et à une membrane avec dix fois plus d'ASQD (40 ASQD) que dans la membrane naturelle, permettant d'accroître et donc de mieux visualiser, l'effet de ce lipide sur l'organisation des membranes.

Table 9. Composition en lipides des membranes pour l'étude de l'organisation d'ASQD chez *Phaeodactylum tricornutum*. La composition naturelle trouvée dans le chloroplaste de *Phaeodactylum tricornutum* est représentée par la membrane 4 ASQD. 0 ASQD est une membrane sans ASQD, et 40 ASQD est une membrane avec dix fois plus d'ASQD que la membrane naturelle. Les quantités sont exprimées en mol. **MGDG** : monogalactosyldiacylglycérol, **DGDG** : digalactosyldiacylglycérol, **SQDG** : sulfoquinovosyldiacylglycérol, **PG** : phosphatidylglycérol, **ASQD** : acyl-sulfoquinovosyldiacylglycérol.

	Composition sans ASQD 0 ASQD	Composition naturelle 4 ASQD	Composition avec 10 fois plus d'ASQD 40 ASQD
MGDG	100	100	100
DGDG	24	24	24
SQDG	40	40	40
PG	13	13	13
ASQD	0	4	40

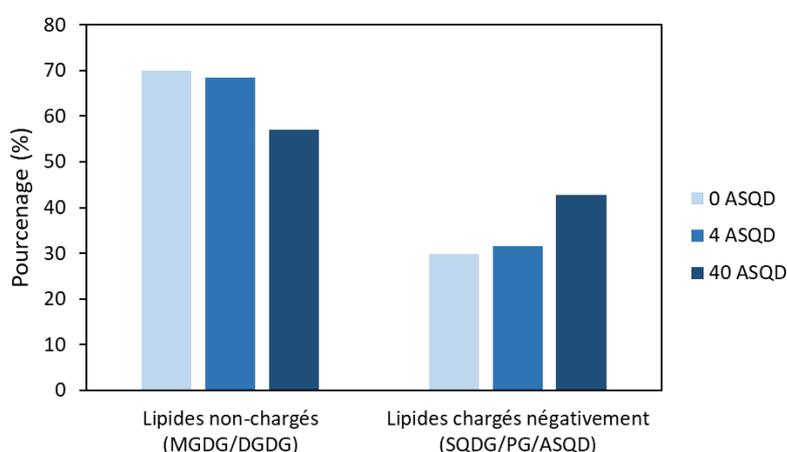


Figure 39. Proportion de lipides neutres et lipides chargés dans les différentes membranes. La proportion de lipides chargés négativement augmente avec l'ajout d'ASQD. **MGDG** : monogalactosyldiacylglycérol, **DGDG** : digalactosyldiacylglycérol, **SQDG** : sulfoquinovosyldiacylglycérol, **PG** : phosphatidylglycérol, **ASQD** : acyl-sulfoquinovosyldiacylglycérol.

La diffraction de neutrons a été faite une première fois avec un solvant de contraste 100 % D₂O, afin d'augmenter le signal de diffraction, puis avec un nouveau mélange de lipides et un contraste à 8 % D₂O, permettant de calculer l'épaisseur de la bicouche. Alors que la première analyse a été faite sur une large gamme d'humidité relative pour les trois membranes, la seconde n'a été faite que sur les membranes 0 ASQD et 40 ASQD à trois humidités intermédiaires.

3.1 Résultats

3.1.1 Organisation lamellaire des membranes

L'organisation des membranes déposées sur le wafer de silicium est suivie pour chaque humidité. A faible humidité, les membranes ne semblent pas s'organiser en motifs répétés, car un seul pic de Bragg très peu intense se distingue sur les images détecteur (*Figure 40*). En revanche, les membranes 4 ASQD semblent s'organiser en motif hexagonale inversée HII. Ce résultat paraît étonnant car la membrane 40 ASQD ne montre pas cette organisation, ce qui permet de déduire que l'ASQD n'est pas responsable de cette configuration. Parmi les lipides présents dans la composition de ces membranes, seul le MGDG peut s'organiser de façon spontanée en phase HII (Jouhet, 2013). De plus, la composition des membranes naturelles est souvent proche de la transition de phase, favorisant la formation de domaine HII dans une bicouche. Ces domaines sont importants pour certaines activités enzymatiques, comme la violaxanthine désépoxydase (Latowski et al., 2004) impliquée dans le non-photochemical quenching, mécanisme de protection de la photosynthèse en cas de forte intensité lumineuse. Une hypothèse serait donc que la proportion de MGDG, prélevée lors de la préparation de cette membrane, était légèrement supérieure à celle des autres membranes, et que la proportion des autres lipides présents n'a pas été suffisante pour éviter la formation de la phase hexagonale. Ensuite, à plus forte humidité, les trois membranes adoptent une organisation lamellaire avec deux ordres de diffraction (*Figure 41*).

La périodicité d des trois membranes est mesurée à 100 % D₂O, puis est comparée sur toute la gamme d'humidité sur un même graphique (*Figure 42*). La période évolue de la même manière pour ces trois membranes au cours de l'hydratation. Alors que la période mesurée à forte humidité (environ 100 %) est identique pour les membranes 0 ASQD et 40 ASQD, elle semble légèrement plus grande d'environ 2 Å pour le film 4 ASQD. Mais avec les incertitudes de mesure de la période, les valeurs de d se recoupent pour les trois membranes, ne les rendant pas significativement différentes. Pour la période, la longueur de décroissance de la pression est dépendante des effets de la force d'hydratation et de la compression de membrane (Kowalik et al., 2017). Elle est calculée à partir de la régression exponentielle des points $f(d; \Pi)$ selon la formule $\Pi = \Pi_0 e^{-d/\lambda}$, avec d la période et λ la longueur de décroissance de la pression définit par (Kowalik et al., 2017). Pour les trois membranes, la longueur de décroissance de la pression est calculée à $\lambda_0 = 4,6$ Å, $\lambda_4 = 5,9$ Å et $\lambda_{40} = 5,6$ Å, respectivement pour les compositions 0 ASQD, 4 ASQD et 40 ASQD. Les trois longueurs de décroissance sont du même ordre de grandeur, indiquant que les forces exercées sur chaque membrane sont similaires. La longueur de décroissance de la composition 0 ASQD légèrement inférieure aux deux autres pourrait être dû à une

proportion inférieure de lipides chargés négativement dans la membrane, réduisant l'effet répulsif et donc la longueur de décroissance.

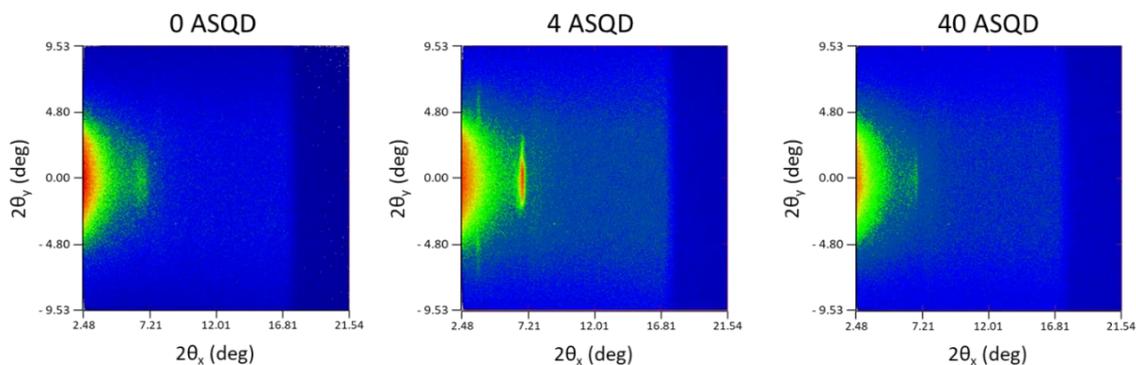


Figure 40. Images détecteur $I(2\theta_x, 2\theta_y)$ à faible humidité ($RH = 54\%$) des trois membranes. Un seul pic de Bragg peu intense est présent, indiquant une désorganisation des membranes. Le film 4 ASQD montre une organisation hexagonale inversée HII. Les mesures sont faites à 25°C , avec un contraste 100% D_2O .

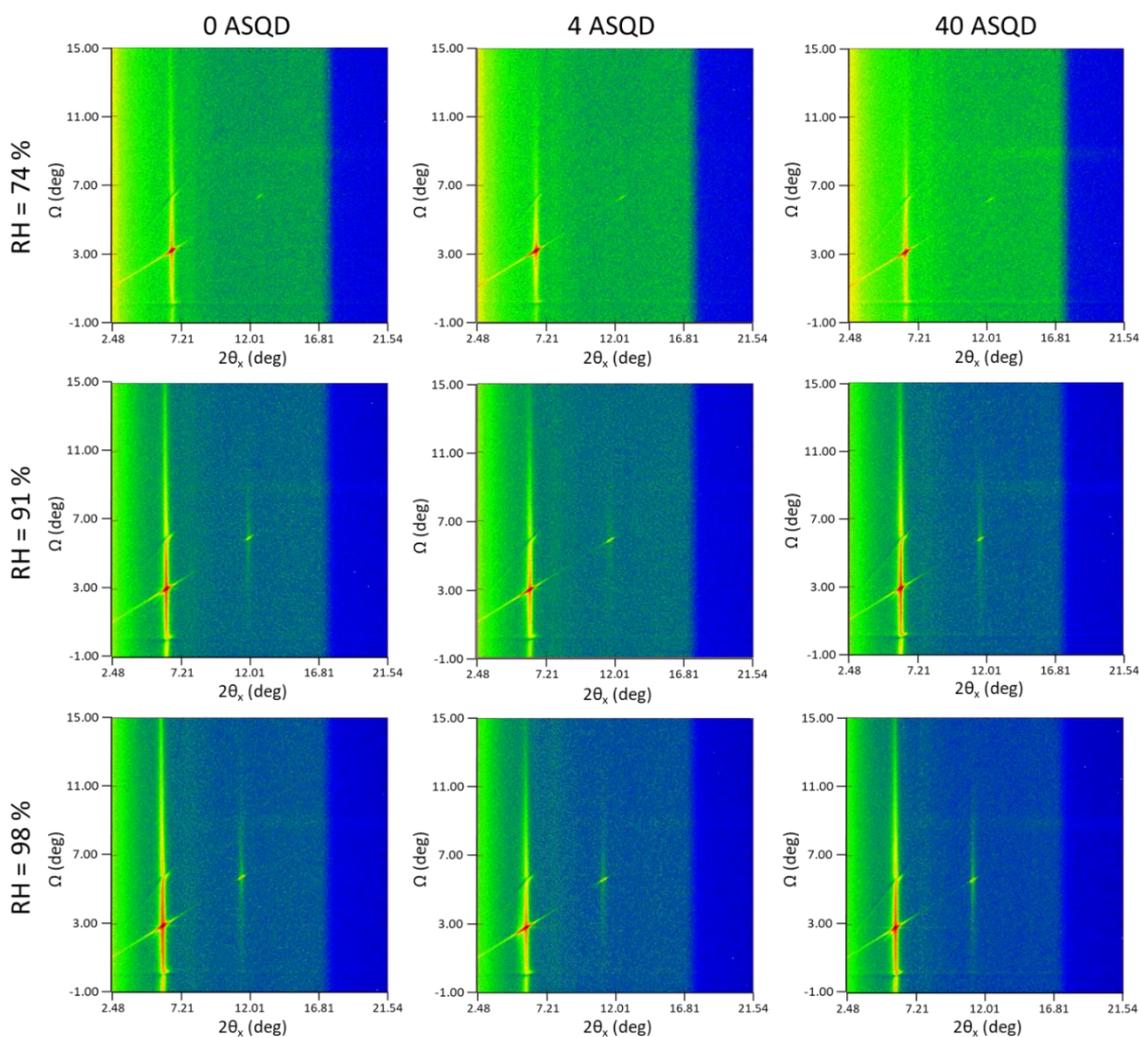


Figure 41. Scans de diffraction $I(2\theta_x, \Omega)$ des trois compositions lipidiques, 0 ASQD, 4 ASQD et 40 ASQD, à trois humidités. Les trois films ont une organisation lamellaire avec 2 ordres de diffraction. Les mesures sont faites à 25°C , avec un contraste 100% D_2O . Valeurs des humidités relatives : pour 0 ASQD : 73.2, 90.1, et 98.6 %, pour 4 ASQD : 73.3, 90.5, et 96.0 %, pour 40 ASQD : 74.2, 91.1, et 96.4 %.

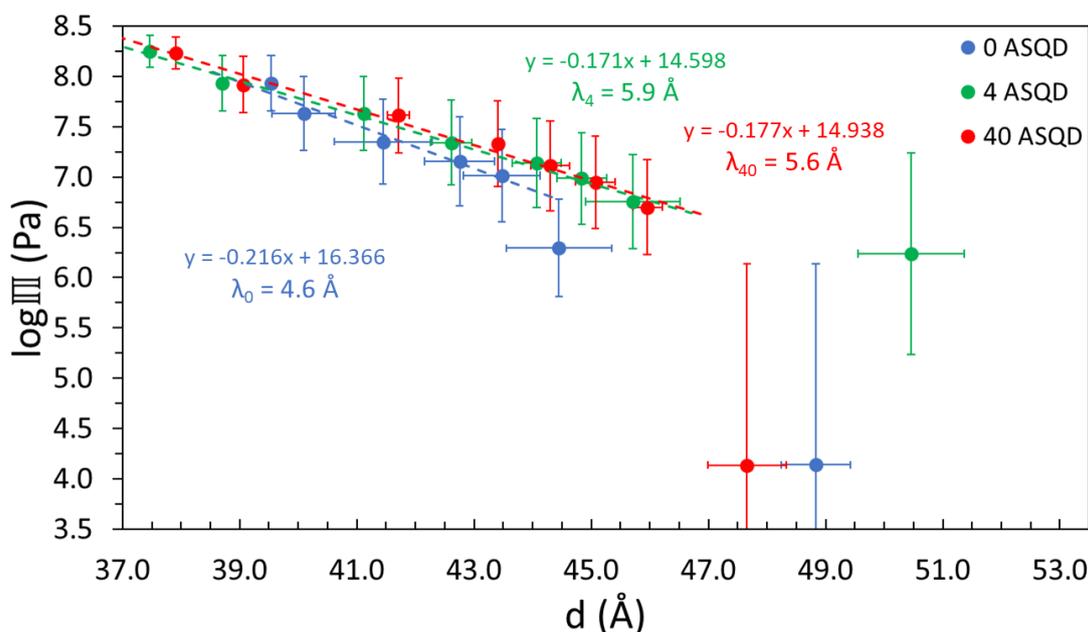


Figure 42. Comparaison de la période d des trois membranes mesurées à 100 % D₂O, à 25°C. Avec l'augmentation de l'humidité, la période évolue de manière similaire pour les trois échantillons. Les longueurs de décroissance de la pression sont du même ordre de grandeur et sont calculées à 4.6, 5.9 et 5.6 Å, respectivement pour 0 ASQD (bleu), 4 ASQD (vert) et 40 ASQD (rouge).

3.1.2 Epaisseurs de bicouche et de couche d'eau des membranes

Les mesures réalisées avec le solvant de contraste 8 % D₂O, permettent de calculer la NSLD et de déterminer l'épaisseur de la bicouche et de la couche d'eau de ces membranes. Par manque de temps de faisceau de neutrons disponible sur l'instrument D16, seulement deux des trois membranes sont analysées avec ce contraste, à trois humidités. Les membranes 0 ASQD et 40 ASQD ont été choisies pour comparer l'impact de la présence d'ASQD sur les propriétés structurales de la membrane par rapport à une membrane sans ASQD, et également pour augmenter son effet potentiel en choisissant la membrane la plus riche en ASQD.

3.1.2.1 Comparaison des expériences à 100 % et 8 % D₂O

Afin de s'assurer que les deux expériences étaient reproductibles entre les deux années, en ayant refait le mélange de lipides pour la deuxième, la périodicité d des membranes est calculée et comparée (Figure 43). Aux incertitudes près pour chaque membrane, les deux jeux de données, mesurés à un contraste différent, sont similaires. Le petit décalage dans les courbes pour film 0 ASQD peut s'expliquer par une proportion des lipides légèrement différente entre les deux échantillons, modifiant l'équilibre des forces répulsives comme l'hydratation, et attractives. Mais comme les incertitudes se recoupent et que les pentes associées à la régression linéaire sont du même ordre de grandeur ($-0,22 \pm 0,03$ et $-0,25 \pm 0,02$, respectivement pour 100 et 8 % D₂O), les deux analyses réalisées

à deux contrastes différents ne sont pas significativement différentes, donc sont considérées comme similaires.

Le dernier point, au contraste 100 % D₂O dans les deux membranes, représente la plus forte humidité RH proche de 100 % pour laquelle l'incertitude associée est très élevée du fait de la divergence de la pression osmotique lorsque l'humidité relative tend vers 100 %. Une variation de température 0,05°C suffit à modifier l'humidité de 1 %. Ainsi, plus l'humidité relative s'approche de 100 %, plus il est difficile de déterminer avec exactitude la valeur réelle de la pression osmotique de l'échantillon dans la chambre.

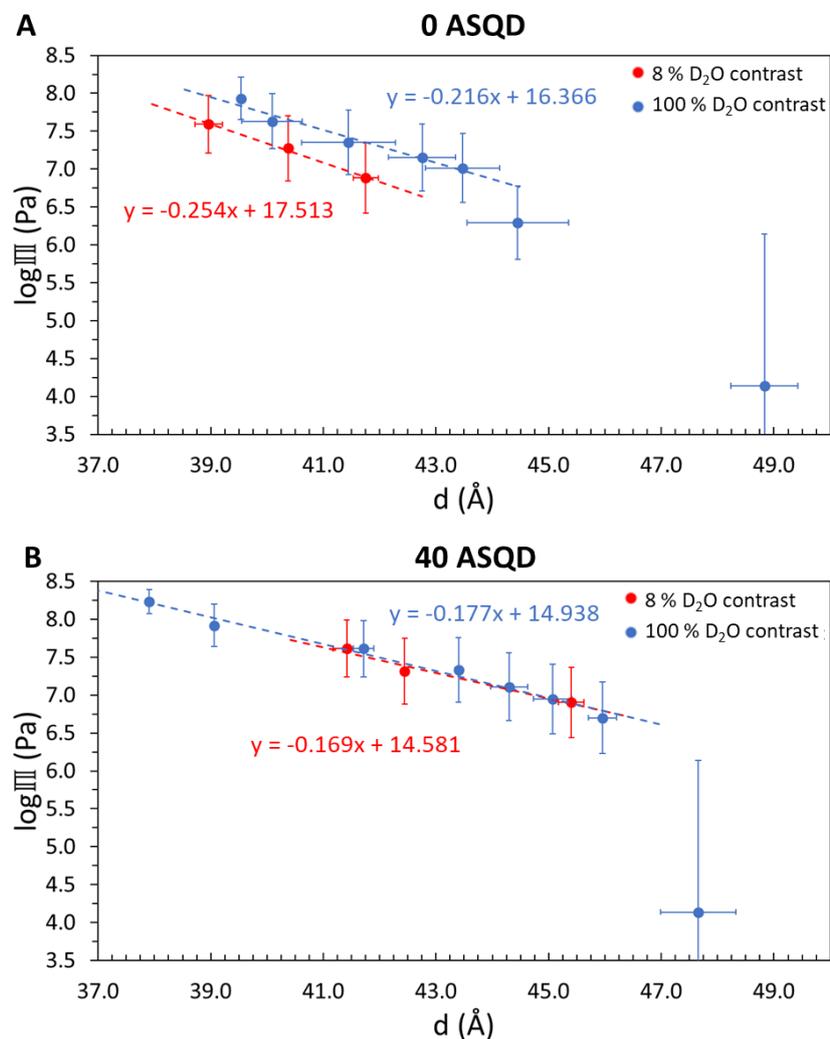


Figure 43. Comparaison de la période d mesurée à deux contrastes (100 % et 8 % D₂O, respectivement en **bleu** et en **rouge**) sur deux années différentes. **A.** Périodicité de la composition lipidique 0 ASQD. **B.** Périodicité de la composition lipidique 40 ASQD.

3.1.2.2 Profils NSLD et épaisseurs

Les profils NSLD (Figure 44) ont été calculés avec deux pics de Bragg seulement, sauf à l'humidité RH = 94,6 % du film lipidique 0 ASQD pour lequel trois pics de Bragg étaient observés. Visuellement, en suivant les maximums des profils par les lignes en pointillés noirs, l'épaisseur de la bicouche d_b , correspondant à la distance entre les milieux têtes polaires, ne semble pas être impactée par l'hydratation, contrairement à l'épaisseur de la couche d'eau d_w qui augmente avec l'hydratation.

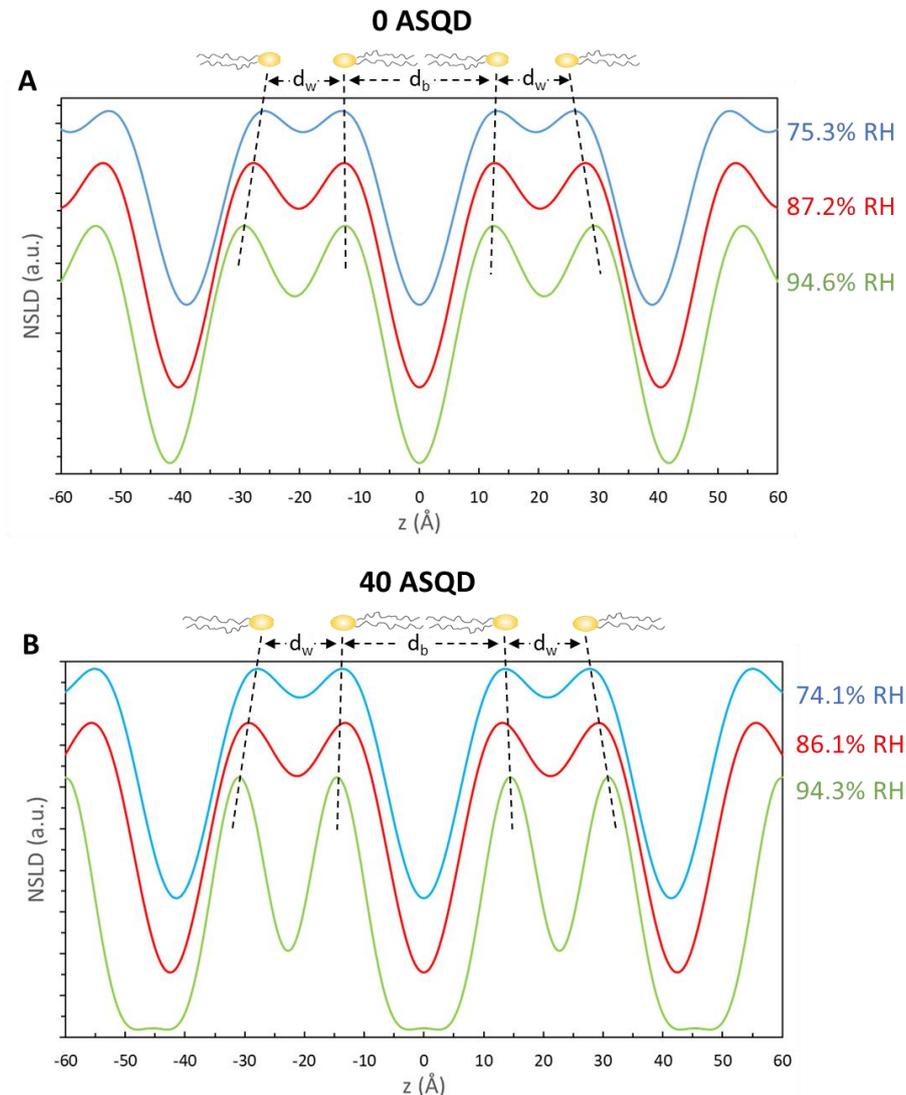


Figure 44. Profils de densité des neutrons (NSLD) des membranes 0 ASQD (A) et 40 ASQD (B), mesurées à 25°C à un contraste 8 % D₂O. Trois mesures à trois humidités différentes ont été faites. L'épaisseur de la bicouche d_b correspond à la distance tête-tête autour de $z = 0$, comme décrit dans (Nagle and Tristram-Nagle, 2000). L'épaisseur de la couche d'eau est calculée par $d_w = d - d_b$, avec d la période lamellaire. Les pointillés noirs montrent le décalage du maximum entre les profils NSLD, indiquant la tendance de l'évolution des épaisseurs d_b et d_w avec l'hydratation.

De ces profils, les valeurs de d_b sont extraites numériquement par fit gaussien des maximums, puis celles de d_w sont calculées avec $d_w = d - d_b$. Comme observée visuellement, l'épaisseur de la bicouche d_b n'est pas impactée par l'hydratation pour ces humidités-là (*Figure 45.A*). En effet, elle varie dans une gamme de 1 Å pour la composition lipidique 0 ASQD, et de 2 Å pour le film de lipides 40 ASQD, ce qui est considéré comme du même ordre en termes d'épaisseur. Les épaisseurs moyennes des bicouches sont mesurées à $25,7 \pm 0,7$ Å et $27,8 \pm 1,2$ Å, respectivement pour 0 ASQD et 40 ASQD.

L'épaisseur de la couche d'eau d_w augmente avec l'hydratation d'environ 4 Å pour les deux membranes (de 12,5 à 16,5 Å environ entre l'humidité la plus basse et l'humidité la plus haute) (*Figure 45.B*). La longueur de décroissance de la pression, calculée à partir de la régression exponentielle des données de l'épaisseur de la couche d'eau, correspond cette fois aux forces d'hydratation exercées sur les membranes. On mesure $\lambda_{d_w0} = 5,9$ Å et $\lambda_{d_w40} = 4,3$ Å. Comme pour la longueur de décroissance de la pression calculée à partir de la période d , la longueur de décroissance de la pression calculée à partir de l'épaisseur de la couche d'eau d_w est du même ordre pour les deux membranes, mais légèrement plus petite pour 40 ASQD. L'ajout d'ASQD dans la membrane, rajoute des têtes polaires chargées, augmentant l'effet répulsif entre deux bicouches. Or ici, c'est le phénomène inverse qui est observé, l'effet répulsif entre les membranes 40 ASQD est plus faible qu'entre les membranes 0 ASQD. Avec ce résultat, l'hypothèse de l'ancrage du troisième acide gras dans une membrane adjacente pourrait être validée, car l'ajout de l'ASQD dans les membranes semble aller contre les effets répulsifs qu'apporte la tête polaire. Or, l'épaisseur de la couche d'eau ne semble pas très impactée par la présence d'ASQD. Est-ce que la gamme d'humidité est trop faible pour observer un phénomène de pontage entre deux membranes ? Une analyse à une humidité très élevée, proche de 100 %, doit être réalisée pour confirmer cette nouvelle hypothèse.

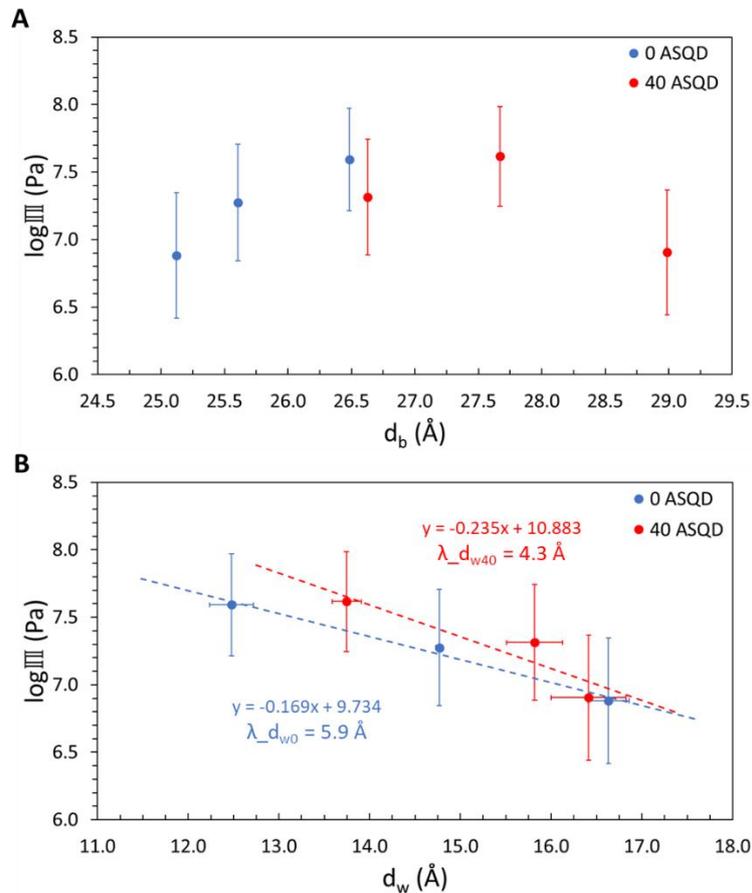


Figure 45. Epaisseur de la bicouche d_b (A) et de la couche d'eau d_w (B) en fonction de l'hydratation pour les membranes 0 ASQD (bleu) et 40 ASQD (rouge). L'épaisseur de la bicouche reste constante pour les deux compositions lipidiques avec une moyenne de $25,7 \pm 0,7 \text{ \AA}$ et $27,8 \pm 1,2 \text{ \AA}$, respectivement pour 0 ASQD et 40 ASQD. L'épaisseur de la couche d'eau augmente avec l'hydratation. Les mesures ont été faites à 25°C .

L'expérience réalisée à un contraste de 100 % D_2O a permis d'atteindre des pressions plus élevées, ce qui permet de calculer d_{w100} à partir de la période d_{100} à laquelle est retranchée l'épaisseur moyenne de la bicouche, déterminée avec le contraste 8 % D_2O et en la supposant constante à toutes les humidités. Il en découle la formule $d_{w100} = d_{100} - \overline{d_{b8}}$, permettant de construire le graphique présenté en Figure 46. Les deux courbes suivent la même tendance, avec une augmentation de l'épaisseur de la couche d'eau avec l'hydratation. Les longueurs de décroissance de la pression calculées pour les deux membranes sont $\lambda_{d_{w0}} = 3,6 \text{ \AA}$ et $\lambda_{d_{w40}} = 5,6 \text{ \AA}$. Ce résultat suggère donc que les membranes 0 ASQD sont moins répulsives que les membranes 40 ASQD, en accord avec le nombre de charges des têtes polaires qui composent les membranes, et donc, que l'hypothèse de l'ancrage du troisième acide gras dans une membrane adjacente semble être réfutée.

Ainsi, l'évolution de la couche d'eau avec l'hydratation semble être en désaccord entre les données expérimentales réalisées à 8 % D_2O (d_{w8}) et les données théoriques calculées (d_{w100}). En effet, dans les premières données, les résultats semblent être en faveur de l'hypothèse 2, où l'ancrage du

troisième acide gras dans une membrane adjacente est possible, car $\lambda_{dw40} < \lambda_{dw0}$. Comme l'analyse a été réalisée avec seulement trois points d'humidité, il est impossible de confirmer avec certitude ce résultat. En revanche, les données théoriques de d_{w100} sont en contraction avec les précédentes données, car cette fois $\lambda_{dw40} > \lambda_{dw0}$, réfutant donc l'hypothèse de l'ancrage de l'acide gras à une membrane adjacente (hypothèse 2).

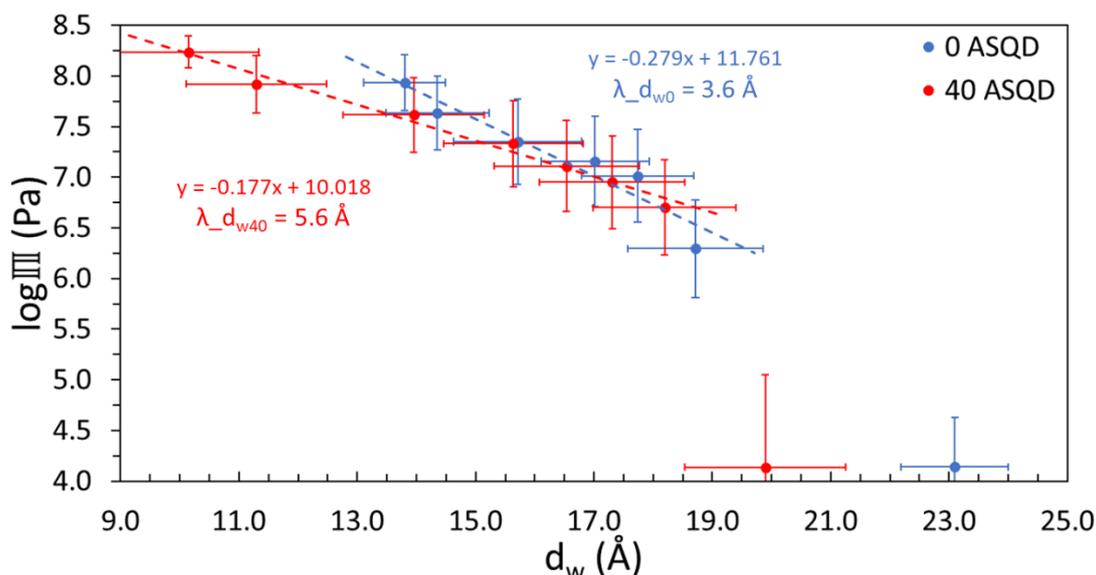


Figure 46. Epaisseur de la couche d'eau d_w en fonction de l'hydratation pour les deux membranes 0 ASQD (bleu) et 40 ASQD (rouge). Ce graphique a été calculé à partir de la période d mesurée à 100 % D₂O et l'épaisseur de la bicouche moyenne mesurée à 8 % D₂O, selon la formule $d_{w100} = d_{100} - \overline{d_{b8}}$. La longueur de décroissance de la pression est calculée avec $\lambda_{dw0} = 3,6 \text{ \AA}$ et $\lambda_{dw40} = 5,6 \text{ \AA}$, respectivement pour les membranes 0 ASQD et 40 ASQD.

3.2 Conclusion et perspectives

La conformation du troisième acide gras estérifié sur la tête polaire de l'ASQD est encore inconnue dans la littérature. Deux hypothèses ont été formulées, soit l'acide gras est situé dans la même membrane que les deux autres, soit il permet d'ancrer une membrane adjacente. Les analyses en diffraction de neutrons conduites dans ce projet, ne semblent pas en accord en fonction de la méthode adoptée. En effet, les premiers résultats à 8 % D₂O (Figure 45) montrent que l'épaisseur de la couche d'eau entre les membranes 40 ASQD gonfle moins rapidement qu'entre les membranes 0 ASQD. Alors que la tête polaire d'ASQD favoriserait la répulsion des bicouches avec l'ajout de charges négatives, le résultat suggère pourtant qu'ASQD retient les deux bicouches (hypothèse 2). Mais ce résultat peut être discuté du fait du manque de données à plus forte humidité, qui reflèteraient plus les conditions physiologiques dans une cellule. Dans cette étude, l'humidité maximale atteinte était de 94 %. Ensuite, la Figure 46, construite à partir de deux expériences, montre le résultat opposé, avec les membranes 40 ASQD plus répulsives que les membranes 0 ASQD, réfutant donc l'hypothèse de

l'ancrage de l'acide gras dans une membrane adjacente (en faveur de l'hypothèse 1). Il se pourrait que le calcul ne soit pas tout à fait correct, car l'épaisseur de la bicouche moyenne n'a été déterminée qu'à partir de trois points supposés constants avant de la retrancher à la période, impactant donc la valeur théorique finale de la couche d'eau. De plus, les résultats des longueurs de décroissance et les tendances des droites obtenues ne semblent pas apporter réellement de réponse claire, car elles semblent du même ordre aux incertitudes près. Ainsi, cette étude préliminaire n'apporte pas de réponse sur l'organisation de l'ASQD dans la membrane.

En revanche, l'ajout d'ASQD dans les membranes ne semble pas avoir d'impact sur l'épaisseur de la bicouche. Ce résultat était attendu, car les lipides utilisés dans ces analyses sont extraits de *Phaeodactylum tricornutum* et contiennent donc toutes les classes d'acides gras de la microalgue. De plus, l'acide gras 20:5, du fait de ces insaturations, se replie, réduisant sa longueur dans la membrane, similaire à la longueur du C18 (Fernandes et al., 2002). Ainsi, d'un point de vue structurale, l'ajout d'ASQD ne modifie pas les propriétés biophysiques de la bicouche.

Un film biomimétique comportant 70 µg d'ASQD pur naturel a été analysé par diffraction de neutrons. Mais aucun signal de diffraction n'a été visible sur les scans $I(2\theta_x, \Omega)$. Soit la quantité déposée n'était pas suffisante pour voir un signal de diffraction, soit l'ASQD ne peut pas s'organiser seul, ou présente une phase amorphe comme la PC 22:6/22:6 de l'étude précédente. Pour avoir une quantité plus abondante d'ASQD (au minimum 500 µg pour être sûr d'être visible aux neutrons), il est nécessaire de réaliser de nombreuses extractions lipidiques et migrations chromatographiques, ce qui représente un coût, car ce lipide est peu abondant dans les membranes naturelles (< 0,1 nmol de lipides pour 10⁶ cellules chez *Phaeodactylum tricornutum* (Abida et al., 2015)).

Cette étude apporte quelques éléments sur les propriétés biophysiques de l'ASQD, mais son rôle pour la cellule n'est toujours pas connu. L'ASQD n'est pas très abondant dans la cellule, et lors d'une carence en phosphate, sa quantité augmente, comme celles des galactolipides MGDG, DGDG et SQDG (Abida et al., 2015). Comme l'encombrement de sa partie hydrophobe est plus large que celui de la tête polaire, l'ASQD pourrait favoriser le maintien des structures courbes, en formant des motifs hexagonaux comme le MGDG (Jouhet, 2013). Il est possible également que ce lipide serve de réserve d'acide gras à très longue chaîne, facilement utilisable et remobilisable par d'autres lipides lors de stress environnementaux, car déjà présent dans la membrane. Cela permettrait donc à la cellule d'économiser de l'énergie pour la formation d'un nouvel acide gras 20:5.

Pour la suite de ce projet, il serait donc primordial de refaire une expérience de diffraction de neutrons sur une plus large gamme d'humidité avec un contraste de solvant à 8 % D₂O. Cela

permettrait d'avoir accès à l'évolution des épaisseurs de bicouche et de couche d'eau au cours de l'hydratation, et ainsi de valider ou réfuter l'hypothèse de l'ancrage du troisième acide gras dans une membrane adjacente. Si cette hypothèse est validée, le résultat attendu serait donc, une augmentation légère voire nulle de la couche d'eau aux fortes humidités, dû au maintien des membranes en contact apporté par l'acide gras supplémentaire de l'ASQD. Cela entraînerait donc une longueur de décroissance de la pression plus petite que pour une membrane sans ASQD. Si les résultats ne montrent toujours rien, une expérience de SANS (*Small Angle Neutron Scattering*) sur des vésicules pourrait être envisagée, permettant de déterminer une limite de gonflement possible des membranes.

Chez les angiospermes, les thylakoïdes sont empilés sous forme de grana reliés entre eux par d'étroites protubérances membranaires (Daum and Kuhlbrandt, 2011), permettant d'accumuler des membranes photosynthétiques de l'ordre de trois fois la surface d'un terrain de football dans 1 m² de feuilles (Chevalier and Maréchal, 2015). Les membranes photosynthétiques de *Phaeodactylum tricornutum* sont composées de trois couches parallèles de thylakoïdes empilés (Flori et al., 2017; Pysznik and Gibbs, 1992). La différence d'architecture des thylakoïdes et l'empilement de membranes chez *Phaeodactylum tricornutum* pourraient être dû à une différence de composition en lipides, en particulier la présence d'ASQD, qui pourrait favoriser l'accolement des membranes de thylakoïdes si l'acide gras supplémentaire se trouve dans une membrane opposée.

Ensuite, il serait intéressant de déterminer les étapes de synthèse de l'ASQD, et en particulier trouver l'enzyme qui ajoute le troisième acide gras sur la tête polaire. Il semble que sa synthèse dépende de celle du SQDG, car un mutant de la SQDG synthase chez *Chlamydomonas reinhardtii* est déficient en SQDG mais aussi en ASQD (Riekhof et al., 2003). De plus, la composition lipidique des membranes de chaque organite chez *Phaeodactylum tricornutum* n'étant pas connue, la localisation de l'ASQD a été placée arbitrairement dans les membranes du chloroplaste dû à son lien avec SQDG. Il serait donc intéressant de déterminer plus précisément la localisation de l'ASQD *in vivo*, par immunolocalisation par exemple, comme ce qui a précédemment été fait pour la localisation du DGDG (Boudière et al., 2012), et ce, dans des conditions normales de culture, ou en carence de phosphate. Ainsi, la remobilisation de l'ASQD dans la membrane en cas de carence nutritive pourrait être observée, et donc son rôle pourrait être affiné. Cela permettrait de confirmer ou réfuter l'hypothèse formulée sur le maintien de la courbure de membrane. Une comparaison entre *Phaeodactylum tricornutum* et *Chlamydomonas reinhardtii*, possédant tous deux de l'ASQD, pourrait permettre de confirmer les résultats, ou au contraire trouver des rôles distincts chez les deux organismes, chacun ayant des longueurs de chaînes d'acides gras différentes.

PARTIE 2 :
**Etudes des lipides des plantes
supérieures chez *Arabidopsis
thaliana***

Chapitre 3 :

Comparaison des propriétés biophysiques du PG et du SQDG

1 Préambule

Chez les plantes supérieures, la carence de phosphate se manifeste par un remodelage de leur composition en lipides des membranes, très largement décrit dans la littérature. Alors que la quantité de phospholipides diminue pour remobiliser le phosphate dans les fonctions vitales dans la cellule (Wang et al., 2019; Wu et al., 2003), la quantité de lipides non-phosphorés (galactolipides et sulfolipides) augmente en compensation pour conserver des membranes fonctionnelles (Essigmann et al., 1998; Härtel et al., 1998; Jouhet et al., 2004). Parmi la modification de la teneur en lipides, le remplacement du PG par le SQDG est connu chez les plantes et les algues (Benning et al., 1993; Essigmann et al., 1998; Murakami et al., 2018; Sato, 2004; Shimojima, 2011; Yu and Benning, 2003).

Les travaux réalisés dans l'article 2 apportent une réponse biophysique à l'observation biologique par l'utilisation de la diffraction des neutrons. En plus de partager une composition en acides gras très similaires, nous avons montré que les membranes de PG et de SQDG partagent des propriétés biophysiques communes pouvant expliquer leur interchangeabilité lors d'une carence de phosphate.

2 Résultats de l'étude des membranes de PG et de SQDG

Article 2 : Sulfoquinovosyldiacylglycerol is a good substitute for phosphatidylglycerol in photosynthetic membranes during phosphate starvation due to similar biophysical properties.

BOLIK Stéphanie^{1,2}, ALBRIEUX Catherine¹, SCHNECK Emanuel³, DEMÉ Bruno², and JOUHET Juliette¹

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG, LPCV, 38000, Grenoble, France.

²Institut Laue-Langevin, 38000, Grenoble, France.

³Institute for Condensed Matter Physics, TU Darmstadt, Hochschulstraße 8, 64289 Darmstadt, Germany

N.B.1 : Cet article a été soumis à Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes Journal

N.B.2 : La numérotation des figures est indépendante du manuscrit de thèse

N.B.3 : Les données numériques sont présentées en Annexes de ce manuscrit

Sulfoquinovosyldiacylglycerol is an efficient substitute for phosphatidylglycerol in photosynthetic membranes during phosphate starvation

BOLIK Stéphanie^{1,2}, ALBRIEUX Catherine¹, SCHNECK Emanuel³, DEMÉ Bruno², and JOUHET Juliette¹.

Address:

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG, LPCV, 38000, Grenoble, France.

²Institut Laue-Langevin, 38000, Grenoble, France.

³Institute for Condensed Matter Physics, TU Darmstadt, Hochschulstraße 8, 64289 Darmstadt, Germany

Corresponding Author: juliette.jouhet@cea.fr, +33 4 38783855 and deme@ill.eu, +33 4 76207311

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interest.

Sample Credit author statement

Stéphanie Bolik: Investigation, Writing- Original draft preparation **Catherine Albrieux:** Resources **Emanuel Schneck:** Investigation, Writing- Reviewing and Editing **Bruno Demé:** Supervision, Writing- Reviewing and Editing **Juliette Jouhet:** Supervision, Writing- Reviewing and Editing.

Acknowledgment

The authors thank the Institut Laue-Langevin for the allocation of beamtime on the D16 diffractometer (<http://doi.org/10.5291/ILL-DATA.8-02-878> and <http://doi.org/10.5291/ILL-DATA.TEST-3119>) and for technical support. SB was supported by a joint funding by the ILL PhD Program and the French National Research Agency in the framework of the "Investissements d'avenir" program Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02) and the Labex GRAL, funded within the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

Abstract (250 words):

From cyanobacteria to higher plants, photosynthetic membranes are composed of two galactolipids, mono- and digalactosyldiacylglycerol (MGDG and DGDG, respectively), and two negatively charged lipids, sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and phosphatidylglycerol (PG). In many environments, plants and algae grow in a shortage of phosphate, leading to the development of phosphate-saving mechanisms. At the cellular level, these mechanisms include conversion of phospholipids into phosphorus-free lipids. In photosynthetic membranes, PG is supposed to be replaced by SQDG. All biological data confirm a complementary relationship between SQDG and PG and suggest the importance of maintaining the total amount of anionic lipids in photosynthetic membranes. Using neutron diffraction on reconstituted SQDG or PG lipid membranes, we demonstrate that, despite chemically different headgroups, PG and SQDG have similar physicochemical properties. With an equivalent diacylglycerol backbone, PG and SQDG membranes have a similar bilayer thickness and bending rigidity. They also have essentially the same response to hydration in terms of repulsion and interaction forces. The results presented here establish that SQDG is a good substitute for PG in phosphate-deficiency conditions to maintain the chloroplast functional organization and its photosynthesis activity.

Keywords:

Sulfolipid, phosphatidylglycerol, neutron membrane diffraction, phosphate starvation, chloroplast

1. Introduction

Chloroplastic cells, where photosynthesis takes place, are composed by 80% of non-phosphorus lipids, mostly galactolipids (Douce and Joyard, 1990; Joyard et al., 1996) but also the sulfolipid the sulfoquinosyldiacylglycerol (SQDG), which is synthesized and localized mainly in chloroplast membranes. Plastid membranes are also characterized by the presence of a phospholipid synthesized in the chloroplast envelope, phosphatidylglycerol (PG) (Block et al., 1984; Douce and Joyard, 1990). In contrast, non-plastidial membranes are mainly composed of phospholipids that are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER). Due to their immobility, plants take the nutrients directly from the soil in their environment. They are exposed to nutrient starvations, and therefore need to cope with the limitation of essential nutrients using adapted metabolisms. Phosphorus is one of the essential macronutrients for plant development, because it composes many molecules important for life, such as DNA and proteins, and because it is necessary for photosynthesis and energy transfer (Carstensen et al., 2018; Thuynsma et al., 2016; Wang et al., 2017).

Under phosphate (Pi) starvation, the strategy for plant cells is to improve Pi absorption, decrease Pi consumption and remobilize Pi reserves. It is well known that the lipid composition is strongly impacted in phosphate starvation with a phospholipid decline and a non-phosphorus lipid synthesis. Indeed, in plant cells, phospholipids constitute one third of Pi reserves (Poirier et al., 1991), and in the ocean, phospholipid synthesis represents more than 18 % of the Pi taken up by the total planktonic community (Van Mooy et al., 2006). In plant cells, non-plastidial membrane phospholipids are replaced by the galactolipid DGDG (digalactosyldiacylglycerol) (Essigmann et al., 1998; Härtel et al., 1998; Jouhet et al., 2004). In algae, betaine lipids are synthesized to compensate the decrease of phospholipids (Murakami et al., 2018; Van Mooy et al., 2009). In both organisms (plants and algae), when cultivated in Pi starvation, the level of PG in photosynthetic membranes decreases significantly. This decrease is compensated by an increase of the SQDG level (Benning et al., 1993; Essigmann et al., 1998; Murakami et al., 2018; Sato, 2004; Shimojima, 2011; Yu and Benning, 2003).

SQDG is synthesized in the chloroplast from diacylglycerol (DAG) by the SQDG synthase (SQD2) adding a UDP-sulfoquinovose (uridine diphosphate-sulfoquinovose) with an α -link on position 3 (*sn-3*) of the glycerol motif (Shimojima, 2011; Yu et al., 2002). PG is synthesized in the plastid, in the mitochondria and in the ER. Phosphatidylglycerophosphate (PGP) synthase catalyzes the conversion of cytidine diphosphate-diacylglycerol and glycerol-3-phosphate to PGP, which is subsequently dephosphorylated to PG by PGP phosphatase (Xu et al., 2006). Genes for PGP synthase have been well characterized, particularly in model organisms such as *Arabidopsis thaliana*, although genes responsible for the PGP phosphatase activity are still not fully revealed (Yoshihara et al., 2021). In *Arabidopsis thaliana*, two homologs for PGP synthase have been identified: PGP1 and PGP2 (Müller and Frentzen, 2001). PGP1 is dually targeted to plastids and mitochondria (Babiychuk et al., 2003), whereas PGP2 is

targeted to the ER (Tanoue et al., 2014). In the *sqd2* mutant of *A. thaliana*, loss of SQDG was accompanied by an increase of PG content (Yu et al., 2002), reinforcing the idea that PG and SQDG are interchangeable.

Lipids contribute to the architecture and physical properties of the membrane in terms of thickness, curvature, fluidity, and interactions. It is already known that PG and SQDG both self-organize in lamellar phase (L_{α}), a multilayer structure composed of parallel stacked bilayers (Seddon, 1990; Shipley et al., 1973). At a given temperature, the membrane fluidity strongly depends on the fatty acid composition. The phase transition temperature indicates the transition between two states of the fatty acid chains: the gel phase, below the transition temperature, where fatty acids are solid (crystalline) and ordered, and the liquid phase, above the transition temperature, where fatty acids are fluid and disordered. The length and the unsaturation number in fatty acid chains modify the transition temperature. In *A. thaliana*, SQDG and PG are rich in fatty acids 16:0 and 18:3. However, PG is the sole lipid that contains 16:1*t* (*trans*) (Browse et al., 1989). Chilling-sensitive plants contain a high proportion of PG 16:0/16:0 and PG 16:0/16:1*t*. The phase transition temperature of these two species is 42 and 32 °C respectively (Bishop and Kenrick, 1987; Murata and Yamaya, 1984). The phase transition temperature of SQDG 16:0/16:0 is 42 °C (Bishop and Kenrick, 1987). This indicates that with a similar fatty acid composition (16:0/16:0), but a distinguished polar head, PG and SQDG have a similar phase transition temperature. So far, PG and SQDG have been widely assumed to be interchangeable without any impact on membrane cell physiology, because they are both anionic, bilayer-forming lipids with similar transition temperature, and because they are located both in the plastids. However, to scrutinize this assumption, a deeper physicochemical characterization and comparison of these two lipids is required.

Neutron diffraction is a powerful and non-destructive technique that gives physical information on the membrane state, such as its organization, the bilayer and water layer thicknesses, the membrane interactions and the membrane bending rigidity. At physiological pH, the polar head of PG is negatively charged as the one of SQDG (*Figure 47*), creating a repulsive electrostatic interaction between adjacent bilayers (Demé et al., 2014; Endo et al., 2016). The phosphate group and the sulfur trioxide carry the negative charge in PG and SQDG respectively.

Experimental studies on the structure of SQDG bilayers are still lacking, but Coarse-Gained Molecular Dynamics (CGMD) simulation studies predicted the SQDG bilayer thickness to be around 44 Å (López et al., 2013; Navarro-Retamal et al., 2018). In contrast, PG bilayers have been studied using both small angle X-ray or neutron scattering (SAXS or SANS) yielding a thickness of 35 Å for PG 16:0/16:0 (DPPG) (Pan et al., 2014, 2012), and 33.9 ± 1.1 Å for the egg PG (Loosley-Millman et al., 1982).

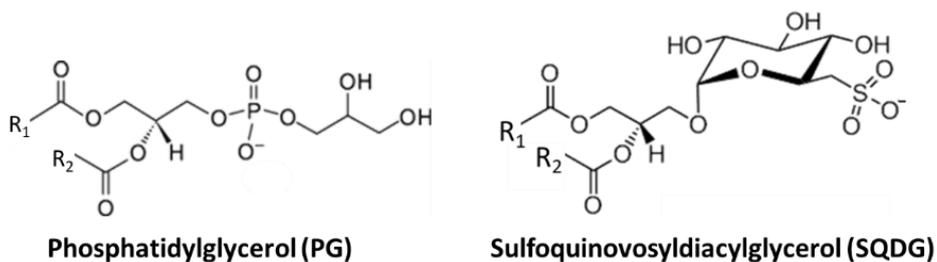


Figure 47. Chemical structures of PG and SQDG. The phosphate or the sulphur trioxide groups carry the negative charge for PG and SQDG, respectively. The two fatty acid chains are denoted with R₁ and R₂.

In this work, using neutron diffraction on PG and SQDG purified from plant, we show that the physicochemical properties of PG and SQDG are very similar. It is well known that PG is essential for photosynthesis and growth of all oxygenic phototrophs examined to date (Kobayashi et al., 2016), whereas the requirement of SQDG for photosynthesis and growth varies with species (Kobayashi, 2016). Because a complementary relationship between SQDG and PG amount in thylakoid exists to maintain a constant amount of anionic lipids in membranes (Yoshihara et al., 2021), our work gives proof to the hypothesis that SQDG is a good substituent for PG inside chloroplast membranes during phosphate starvation.

2. Materials and methods

2.1. Cultivation of *Arabidopsis thaliana* plants

Arabidopsis thaliana plants were first cultivated 15 days in long-day photoperiod (16 hours light/8 hours night) and then 4-5 weeks in short-day photoperiod (8 h light/16 h night) to produce maximum of leaves. The temperature was controlled at 22 °C during the day and 16 °C during the night. The quantity of light was 120 and 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively for the long and short days. The hygrometry was fixed at 60%. Leaves of plants were collected after 6 to 7 weeks of culture. They were immediately dropped in liquid nitrogen to be stored at -80 °C until further lipid extraction.

2.2. Lipid analysis

2.2.1. Lipid extraction

Leaves were lyophilized overnight. In liquid nitrogen, the frozen leaves were grind in powder, and transferred in an Erlenmeyer flask with 120 mL of boiled absolute ethanol during 5 minutes. Lipids were extracted according to Folch (Folch et al., 1957) adding 40 mL of methanol (MeOH) and 160 mL of chloroform (CHCl₃). The Erlenmeyer flask was saturated with argon, then closed and left for 1 h at room temperature on a stirrer. The lipid extract was filtered in a separatory funnel with ethanol washed quartz wool. To rinse the quartz wool, 60 mL CHCl₃/MeOH 2/1 (v/v) were added. After the end of the filtration, 68 mL NaCl 1% were added directly in the separatory funnel, and the solvents were mixed up under argon. Then, the separatory funnel was closed and left overnight for the formation of a biphasic. The organic phase (bottom phase) was collected and dried under argon

in a warm water bath during around 3h30. Lipids were transferred in Pyrex tubes using pure CHCl_3 . After solvent evaporation, lipids were stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.2. Lipid separation by Thin Layer Chromatography (TLC)

1 mg of lipids were separated by two-dimensional thin layer chromatography (TLC) onto glass-backed silica gel plates (Merck). The first solvent was $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Water}$ 65/25/4 (v/v), and the second solvent was $\text{CHCl}_3/\text{Acetone}/\text{MeOH}/\text{Acetic Acid}/\text{Water}$ 50/20/10/10/5 (v/v). Lipids were visualized under UV light, after spraying with 2% 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid in methanol. Each lipid class was scraped off the plate and lipids were extracted from the silica using the Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959). PG and SQDG were quantified by fatty acid methyl esters (FAMES) production and gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID) (Clarus 580, Perkin Elmer), or were analyzed by ion trap mass spectrometry (MS) (Amazon XL, Bruker) to validate their purity and determine the lipid molecules with their fatty acid position on the glycerol backbone, as described in (Abida et al., 2015).

2.3. Neutron diffraction experiments

Neutron diffraction data were collected at the D16 cold neutron diffractometer of the Institut Laue-Langevin (ILL, Grenoble, France).

2.3.1. Sample preparation

Samples consisted of oriented lipid multilayer films (500 μg of dry material) spread from 500 μL chloroform/methanol solution (1/2: v/v) on silicon wafers (3 inches diameter, 275 μm thick) from Si-Mat (Kaufering, Germany). Each wafer was cut to produce a rectangular shape of 20 mm (width) x 75 mm (height). After lipid deposition, the solvent mixture was evaporated at room temperature and pressure until a solid film was obtained, and then dried 30 minutes under vacuum. The samples were then annealed at $25\text{ }^\circ\text{C}$ in saturated D_2O vapor overnight, before transfer into a humidity chamber where the sample was equilibrated before the diffraction experiments.

2.3.2. Relative humidity control

Relative humidity (RH) scans at fixed sample temperature were performed *in situ* using the high-precision BerILL humidity chambers developed at ILL and described elsewhere (Gonthier et al., 2019). The samples were mounted vertically on a manual 4-axis goniometer head (Huber, Germany) embedded in the humidity chamber and pre-aligned using a laser-based optical setup.

For both lipids, the temperature in the chamber was maintained at $25\text{ }^\circ\text{C}$ during the measurements and the humidity was varied by changing the temperature of the water reservoir generating the water vapor. For each sample, the relative humidity was increased and monitored *in situ* step by step after each data collection of the previous RH condition, without opening the chamber at any time during the isothermal humidity scans.

Each sample was incubated in the humidity chamber prior to data collection. Since three identical chambers are available at ILL, two samples can be equilibrated while a third one is being measured. To reach 100% RH at the end of the relative humidity ramping up, the chamber was taken out of the instrument and maintained overnight for further equilibrium at 100%. The resulting range of humidities investigated was 30% to

100% RH. The error associated to the RH value was calculated using the errors of the temperature sensors of the sample and the reservoir bath, estimated to $\delta T_{\text{sample}} = \pm 0.05$ °C and $\delta T_{\text{res}} = \pm 0.05$ °C. To each couple of temperatures corresponds a value of RH, and the standard deviation of the calculated RH is the error δRH .

Typical equilibrium times were ranging from 1 h at low humidity up to 3 h at high humidity. During this *in situ* equilibration phase, the position and intensity of the most intense Bragg reflections was monitored to ensure that for every condition (temperature, RH, and water contrast) the sample was at equilibrium (constant d -spacing and constant intensity of Bragg reflections).

The neutron scattering length density (NSLD) contrast between water and the lipid bilayers was obtained using H₂O/D₂O ratios of 0:100 and 92:8 (v/v). Using the 8% D₂O contrast lipid headgroups are highlighted thank to the zero NSLD of water. From these profiles, the bilayer thickness can be directly extracted (Salvador-Castell et al., 2020).

2.3.3. Osmotic pressure determination

The pressure Π applied to the membrane stacks by precise control of the humidity of the air in equilibrium with the sample, is calculated according to (Parsegian and Rand, 1995):

$$\Pi = -\frac{k_b \times T_{\text{sample}}}{v_w^0} \times \ln\left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (1)$$

where k_b is the Boltzmann constant ($k_b = 1.38 \cdot 10^{-23}$ J.K⁻¹), T_{sample} , the sample temperature, v_w^0 the molecular volume of water (30 Å³) and P/P_0 the relative humidity RH.

The associated error is calculated according to:

$$\delta \Pi = \sqrt{\delta T_{\text{sample}}^2 + \delta \text{RH}^2} \quad (2)$$

2.3.4. Neutron diffraction instrument setup

D16 is a cold neutron diffractometer that uses a highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) monochromator made of nine crystals whose orientation can be set to focus the beam vertically in a continuous manner from unfocused to detector or sample focusing. The wavelength of the neutron beam was $\lambda = 4.47$ Å.

For membrane diffraction experiments, the graphite crystals are oriented in sample focusing geometry combined to a horizontal slit collimation to maximize the incident neutron flux at the sample (3×10^7 N.cm⁻².s⁻¹).

Figure 48 shows the geometry of the experiment in top-view. The incident beam illuminates the sample plane with an adjustable angle of incidence Ω and is scattered into various directions at angles 2θ with respect to the incident beam. For each Ω , the 2θ -dependent intensity is recorded with a position-sensitive ³He detector (MILAND) set to a distance of 950 mm from the sample. This 2D detector is made of 320 X by 320 Y wires spaced by 1 mm providing a pixel resolution of 1 mm x 1 mm and a detection area of 320 x 320 mm. By rotating the sample stage, and thus by stepwise variation of Ω , 2-dimensional maps of the intensity as a function of 2θ and Ω are recorded, as described previously (Schneck et al., 2011, 2008). These so-called “rocking curves” (Ω -scans) were collected by steps of 0.05 deg. in an Ω -range of -1 to 15 deg. In this procedure, the intensity is normalized to the detector pixels’ sensitivity and solid angle, and to the illuminated sample area. The angles 2θ and Ω are

associated with the reciprocal space coordinates q_z and $q_{||}$, i.e., the scattering vector components perpendicular and parallel to the sample plane, respectively, according to the geometrical relations (*Figure 48*):

$$q_z = (2\pi/\lambda)[\sin(2\theta - \Omega) + \sin(\Omega)] \quad (3)$$

and

$$q_{||} = (2\pi/\lambda)[\cos(2\theta - \Omega) - \cos(\Omega)] \quad (4)$$

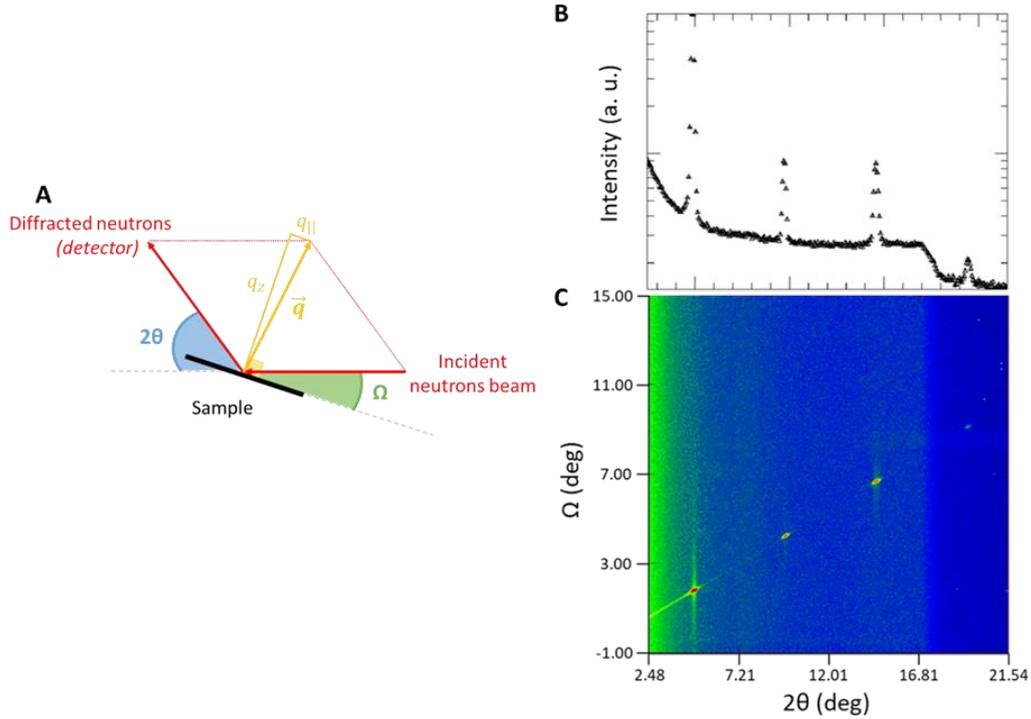


Figure 48. **A.** Sample and beam geometries in top-view. The incident beam (**red**) illuminates the sample (**black**) with an adjustable angle of incidence Ω (**green**). For each Ω , the 2θ -dependent (**blue**) intensity is recorded by the detector. The angles 2θ and Ω are associated with the reciprocal space coordinates q_z and $q_{||}$ (**yellow**). **B.** 1D integrated intensity measured for each Bragg peak. **C.** Reciprocal-space map resulting from a typical Ω -scan $I(2\theta, \Omega)$ showing the Bragg peak positions.

Figure 48.C shows a typical intensity map, termed $I(2\theta, \Omega)$ in the following. It features the characteristic “Bragg sheets” of planar membrane multilayers (Salditt, 2005). The scattering intensity along the specular line ($\theta = \Omega$, $q_{||} = 0$) contains information on the structure perpendicular to the surface (notably the lamellar periodicity as encoded in the Bragg peak positions and the membrane scattering length density profile as encoded in the Bragg peak intensities). The diffuse scattering intensity ($\theta \neq \Omega$, $q_{||} \neq 0$) along the Bragg sheets additionally contains information on the in-plane structure, notably the membrane fluctuations in terms of their spatial self- and cross-correlation functions (Salditt, 2005; Schneck et al., 2011; Sinha et al., 1988).

2.3.5. Data reduction

Sample rocking scans (Ω -scans) were analyzed using the ILL LAMP software (Richard et al., 1996). Each detector frame resulting from an Ω step was normalized to a detector calibration that accounts for the detector pixels’ efficiency and solid angle. Then, each Ω step is reduced to 1D by vertical integration of the intensity in a ROI ($2\theta_y$ vs. $2\theta_x$ range) that corresponds to the location of Bragg peaks. Each Bragg peak position and intensity is

fitted after summation of the intensity in an Ω range of 0.5 deg. (11 steps of 0.05 deg.) centered on the Bragg peak position. The peak shape of the fit to the data was Gaussian and a quadratic function was used for the background. Then, Bragg's law was used to determine the lamellar periodicity d according to:

$$2d\sin\theta_B = n\lambda \quad (5)$$

where θ_B is the half angle of the peak position $2\theta_B$, and λ the wavelength (4.47 Å). A linear fit to the plot $2\sin\theta$ vs. n , considering up to $n = 4$ orders, was used to obtain the d -spacing from the slope $s = \lambda/d$. The error on the d -spacing, δd , was given by propagating the error on the slope of the linear fit to the data.

2.3.6. Neutron scattering length density profiles

Neutron scattering length density profiles (NSLD) were calculated from the integrated intensities of Bragg peaks corrected for the neutron absorption (C_{abs}), and the Lorentz factor correction (C_{Lor}) according to (Harroun et al., 2008), resulting in the corrected discrete structure factor of order n :

$$|F_n|^2 = C_{\text{abs}}C_{\text{Lor}}I_n \quad (6)$$

where I_n is the intensity of the Bragg peak at the order n .

The corrections are given by:

$$C_{\text{abs}} = \frac{\alpha}{1-e^{-\alpha}} \quad , \quad \alpha = \frac{2\mu t}{\sin\theta} \quad (7)$$

$$C_{\text{Lor}} = \sin(2\theta) \quad (8)$$

where μ is the absorption coefficient (5 cm^{-1}), t is the sample thickness calculated from the deposited amount of dry lipid (500 μg) and the sample area (15 cm^2). It is of the order of 10 μm before hydration, for a deposited amount of 1 mg, and scales linearly with the d -spacing as a result of hydration.

The NSLD were were calculated using (Worcester and Franks, 1976):

$$\rho(z) = \frac{2}{d} \sum v_n F_n \cos\left(\frac{2\pi n z}{d}\right) \quad (9)$$

where z is the direction perpendicular to the bilayer planes and v_n corresponds to the phase of the structure factor. At the 8% D_2O contrast, corresponding to the zero NSLD of water, we tested different hypotheses for the discrete structure factor signs to obtain a centrosymmetric SLD profile with a minimum at $z = 0$, the bilayer mid-plane, where methyl groups are located and yield the highest density of hydrogens, and the maximum SLD for the polar head regions. The assigned phases that give the best agreement with these constraints were -, -, +, - in agreement with (Pan et al., 2012).

We consider here as a definition of the bilayer thickness (d_b) the center-to-center distance between lipid polar heads as obtained from a fit to the two headgroup layer positions in the NSLD profile obtained according to Eq.9 (as illustrated in *figure S2*). The error associated to d_b is given by the standard deviation between the fit and the calculated NSLD. Finally, the water layer thickness (d_w) is calculated from the known d -spacing and the bilayer thickness according to:

$$d_w = d - d_b \quad (10)$$

and the error is defined as $\delta d_w = \sqrt{\delta^2 d + \delta^2 d_b}$.

2.3.7. *Bragg sheet analysis*

According to the Discrete Smectic Hamiltonian description of interacting multilayers (Lei et al., 1995), the membrane fluctuation self and cross correlations that give rise to characteristic diffuse scattering are governed by the mechanical properties of the interacting membranes in terms of the membrane bending modulus κ and the inter-membrane compression modulus B . As we have shown earlier, the reciprocal space maps obtained experimentally within this framework can be satisfactorily modeled solely based on the underlying mechanical parameters κ and B , and on an empirical cut-off parameter termed R (Schneck et al., 2011). In practice, this procedure relies on the kinematic approximation (KA) of wave scattering, because application of the more accurate distorted-wave Born approximation (Sinha et al., 1988) would require detailed additional knowledge of the sample structure, which is unavailable. As a consequence, our KA-based treatment, which is only valid wherever the intensity is weak compared to the incident beam, does not correctly capture the specular maximum of the first Bragg sheet, where this condition is typically violated. In line with our more recent work (Latzka et al., 2020), we therefore combine information from the first two Bragg sheets (*figure S3*): while the Caillé parameter:

$$\eta = \pi k_B T / \left(2d^2 \sqrt{\kappa B / d} \right) \quad (11)$$

is obtained from the specular/diffuse scattering intensity ratio in the second Bragg sheet, the de Gennes parameter:

$$\Lambda = \sqrt{\kappa / (Bd)} \quad (12)$$

is obtained from the decay of the off-specular intensity in the first two Bragg sheets along q_{\parallel} . The best-matching values of η , Λ , and R are then determined by their systematic variation in the model until the best agreement with the experimental data is achieved. Absorption close to $\Omega \approx 0$ and $\Omega \approx 2\theta$ was modelled as described previously (Latzka et al., 2020). Finally, the mechanical parameters are obtained by solving Eqs.11 and 12 for κ and B .

3. Results

3.1. Fatty acids composition in PG and SQDG extracted from plant

By ion trap mass spectrometry analysis, the fatty acid composition and the *sn-1*, *sn-2* position of each fatty acid on the glycerol backbone have been determined (*Figure 49*). PG and SQDG contain fatty acids with chain lengths of 16 and 18 carbons, with zero up to 3 unsaturations, corresponding to what is known in the literature for plant lipids (Browse et al., 1989; Burgos et al., 2011). In PG, the unsaturation on fatty acid 16:1 is in *trans*-conformation (Dubacq and Tremolieres, 1983), while the other unsaturations are in *cis*-conformation. This means, that the 16:1*t* in PG looks like a 16:0 in terms of shape, because the *trans* unsaturation does not modify the chain orientation, compared to a *cis*-unsaturation that provides a rigid kink of 30° in the chain (Hyvönen et al., 1997). The presence of a C16 fatty acid in the *sn-2* position of the glycerol backbone in the two lipids, is the signature of a lipid

synthesis occurring inside the chloroplast (also called the “prokaryotic” pathway) (Heinz’ and Roughan, 1983; Roughan et al., 1980).

Around 80% of PG molecules are composed by 18:3/16:1*t* and 18:3/16:0, both lipid molecules adopting an equivalent architecture. This is comparable to SQDG that is rich in 18:3/16:0 (around 50%) and 18:2/16:0 (20%), constituting around 70% of the SQDG molecules. PG contains a double saturated specie 16:0/16:0, and its structural equivalent 16:0/16:1*t*, both representing around 8%, whereas SQDG has no unsaturated C16 species. SQDG contains also around 13% of a double unsaturated molecule 18:3/18:3, and small proportions of combination of unsaturated C18 species. Therefore, the fatty acid composition of these two natural lipids extracted from plant is very similar and so, it should have little influence on the biophysical properties of membranes in comparison to the polar head differences.

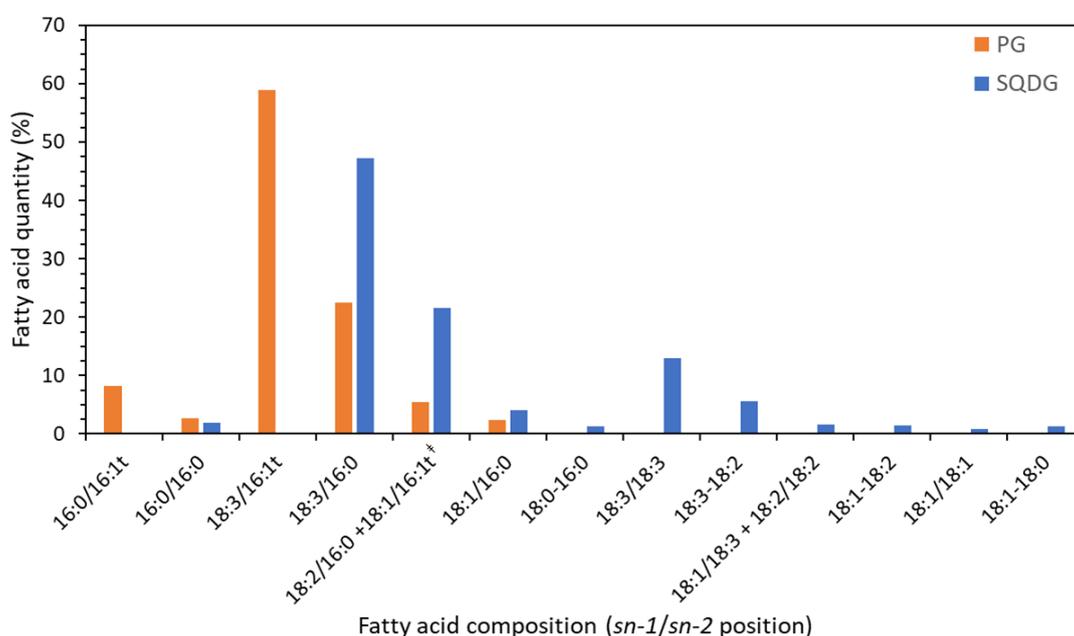


Figure 49. Fatty acid composition and position (*sn-1/sn-2*) of PG and SQDG solved by ion trap type MS. PG (orange) contains a high portion of 18:3/16:1*t* that is equivalent to 18:3/16:0, corresponding together to 80% of the PG molecules, and a small portion of 16:0/16:1*t*, 16:0/16:0 (10%). SQDG (blue) contains a high portion of 18:3/16:0, 18:2/16:0, representing 70% of the SQDG molecules, and a small portion of 18:3/18:3 (13%) and all combinations of unsaturated C18 species. PG is the sole lipid of the thylakoid membranes containing a 16:1 *trans*-conformation. [†]The species 34:2 correspond to 18:2/16:0 in SQDG and 18:2/16:0 and 18:1/16:1*t* in PG.

3.2. Lamellar organization of PG and SQDG membranes

To investigate the mechanical properties of PG and SQDG membranes, lipids were spread at the surface of silicon wafers, and analysed by neutron diffraction. As described in the materials and methods section, the relative humidity inside the chamber was controlled and changed during the experiment, starting at RH = 30% to RH = 100%, and the temperature of samples was maintained at 25 °C. Because PG 16:0/18:1 (POPG) has a melting temperature at -2 °C (Wiedmann et al., 1993), we can

suppose that at 25 °C, due to their fatty acid composition, our natural lipids are in fluid phase for all relative humidities throughout the whole experiment.

At RH = 30%, samples are dehydrated, while at RH = 100% samples are close to full hydration. During hydration, we followed the structural organization of membranes, the d -spacing and the modulation of Bragg peak intensities. The diffraction data confirm that the two lipids types self-organize in lamellar phase as previously described in (Seddon, 1990; Shipley et al., 1973). The presence of a high number of diffraction orders (up to 4) indicates that the bilayers were well correlated along the normal direction (regular d -spacing) (*figure S1*). PG and SQDG are not the main lipids in chloroplast membranes compared to the two galactolipids mono- and digalactosyldiacylglycerol (respectively MGDG and DGDG) (Block et al., 1984). While DGDG also self-organizes in a lamellar phase, MGDG forms a hexagonal phase (Demé et al., 2014). Therefore, MGDG contributes to the locally high curvature of thylakoids membranes, while DGDG, PG and SQDG are lipids that stabilize flat bilayer structures.

The lamellar d -spacing of PG and SQDG was measured at 8% D₂O solvent contrast over the studied humidity range (*Figure 50*). The results are presented in the form of pressure–distance curves, that is, plots of Π versus d . In our experimental conditions, because we worked under controlled vapour pressure, we could not explore the domain of very low osmotic pressure where repulsion falls off much more slowly and is dominated by electrostatic interactions (Loosley-Millman et al., 1982).

For charged lipid at high pressure and at short range, there is clear evidence of an extra non-electrostatic repulsion that could be called “hydration force” (Kowalik et al., 2017; Rand and Parsegian, 1989). However, here we will use the more generic term “short-range repulsion”. The humidity-dependent interaction pressure is found to exhibit an approximately exponential dependence on the lamellar period d (*figure 4*). We made an exponential fit to the data points from *figure 4* with the following equation:

$$\pi = \pi_0 e^{-d/\lambda} \quad (13)$$

with λ representing a decay length as defined in (Kowalik et al., 2017). The observed decay length λ of the lamellar period d includes short-range repulsions and membrane compression effects.

Here, we calculated $\lambda_{PG-d} = 4.5 \text{ \AA}$, and $\lambda_{SQDG-d} = 4.7 \text{ \AA}$, indicating that the decay of the forces exerted at short range between PG or SQDG bilayer are close to each other. This decay length is significantly higher than what could be observed for uncharged lipid such as phosphatidylcholine (Kowalik et al., 2017), indicating that electrostatic repulsion enhances the short-range repulsion. However, the interaction pressure and the membrane compression effects, represented by the decay length, act in the same way in PG and SQDG membranes. In (McIntosh et al., 1990), the authors found a decay length $\lambda = 11 \text{ \AA}$ for DPPG at pH = 7.2. For charged phospholipids, the decay length can be measured between 7 \AA and 13 \AA (McIntosh et al., 1990; Petrache et al., 2000), that is higher than our result. Because we used extracted lipids from plants and not synthetic lipids and because we could

observe in our mass spectrometry analysis some Na^+ adduct of our lipids, maybe our lipid preparations contain some additional salts. This might explain the lower decay length observed in our experiment as compared to the one observed in the literature for synthetic PG.

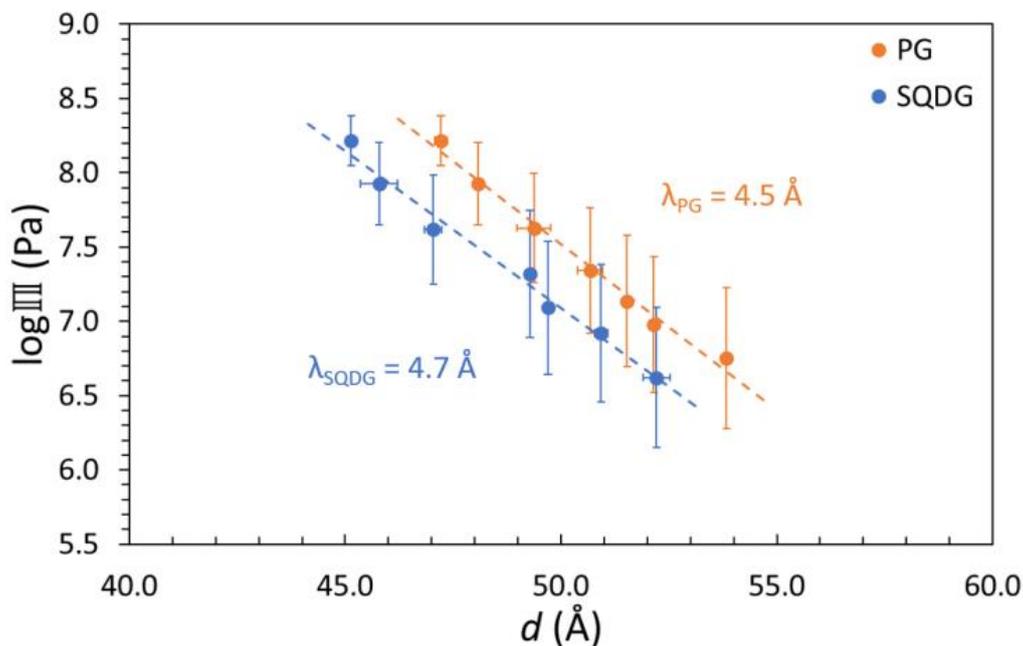


Figure 50. Pressure-distance curves of PG (orange) and SQDG (blue) bilayer stacks at 25 °C with an 8% D_2O contrast. The decays of the d -spacing are very similar for PG and SQDG bilayers.

3.3. Interaction pressures between PG and SQDG membranes

To disentangle the bilayer compression from the interaction forces between membranes, we need to estimate the decay length of the hydration pressure *versus* the water layer thickness. Because experiments were performed at 8% D_2O solvent contrast, that highlights the higher density headgroups (Salvador-Castell et al., 2020), the calculated NSLD profiles give access to the bilayer and water layer thicknesses for the two lipids and at each investigated humidity (*figure S2*). The NSLD profiles are considered reliable if there is a minimum of 3 orders of diffraction in the neutron diffraction pattern and therefore could not be computed at the lowest humidity ($\text{RH} = 30\%$), where only 2 orders of diffraction are observed. In our NSLD profiles, the two peaks correspond to the middle of the polar head layers of a bilayer as described in (Nagle and Tristram-Nagle, 2000). Then we extracted the water layer thickness according to $d_w = d - d_b$ at each humidity for the two lipids (*Figure 51.A and B*).

The results show that d_w increases exponentially with the same slope during swelling by 8 Å in both PG and SQDG membranes. In addition, the decay length estimated at $\lambda_{\text{PG}_d_w} = 6.4$ Å, and $\lambda_{\text{SQDG}_d_w} = 7.2$ Å are in the same range, confirming that the short-range repulsion is similar for PG and SQDG bilayers. In the literature, the decay length of PG is reported between 4.8 and 9.7 Å (Loosley-Millman et al., 1982), that is consistent with our results.

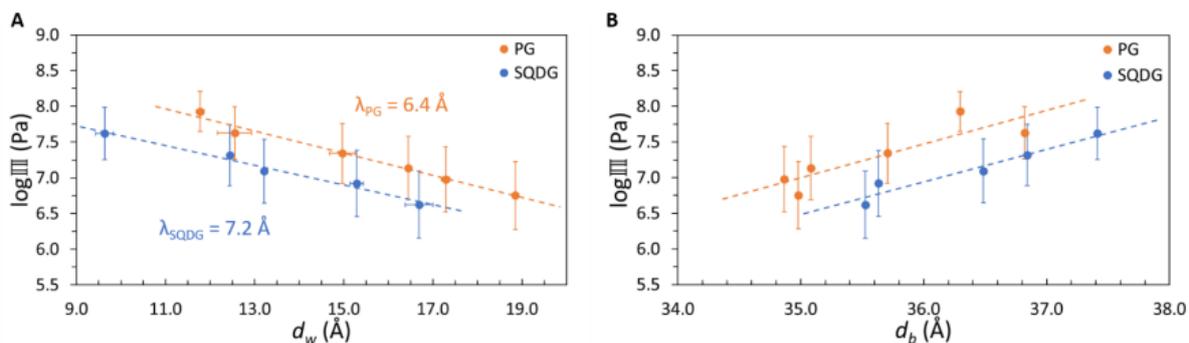


Figure 51. Pressure-distance (d_w) (A) and pressure-membrane thickness (d_b) (B) curves of PG (orange) and SQDG (blue), measured at 25 °C.

3.4. PG and SQDG bilayer thickness

For the two lipids, the decay lengths of the lamellar period and the water layer agree. We confirmed this result by plotting the pressure-membrane thickness curve (Figure 51.B). Indeed, the bilayer thicknesses of PG and SQDG decrease with the increase of hydration, by around 2 Å. The decrease of the bilayer thickness upon hydration is expected because the hydration favours disordering of the lipid components of the bilayer as previously reported for DOPC (Stachura et al., 2019). For PG, the bilayer thickness ranges from 36.8 to 35.7 Å, in agreement with the bilayer thickness described in the literature, measured at $36.7 \pm 0.7 \text{ \AA}$ and 38.5 Å in POPG membranes (PG 16:0/18:1) (respectively in (Kučerka et al., 2011) and (Pan et al., 2014), (Shahane et al., 2019)). For SQDG, the bilayer thickness decreases from 37.4 to 35.5 Å, *i.e.* 1.9 Å, slightly more than the PG bilayer thickness (1.1 Å). We have no literature data for this lipid, only Coarse-Grained Molecular Dynamics (CGMD) simulations have been done on SQDG lipid. The bilayer thickness is calculated at 44 Å (Navarro-Retamal et al., 2018) and 45 Å (López et al., 2013) for fully saturated SQDG. These results obtained by simulations are higher than our experimental data, because they used fully saturated lipid chains that increase the fatty acid chain length, compared to a *cis*-unsaturated fatty acid that introduces angles in the carbon chain, and lead to its folding (Fernandes et al., 2002).

In our experiment, PG and SQDG bilayers essentially respond in the same way to hydration. Altogether, the bilayer thickness of PG and SQDG membranes is only slightly impacted by the hydration, compared to the water layer thicknesses, meaning that the hydration has a small impact on the bilayer compression, but has an influence on the swelling of water layer as already described for charged phospholipids (McIntosh et al., 1990).

As previously mentioned, PG and SQDG are two negatively charged lipids able to self-organize in lamellar phase and with this study, we show that the physical parameters are very similar. We also looked at the mechanical properties of bilayers, by analysing the off-specular intensity of the Bragg sheets at 100% D₂O (figure S1). Figure S3 shows the first two Bragg sheets obtained with PG and SQDG in D₂O atmosphere at 96% RH. Plotted are the q_z -integrated Bragg sheet intensities as a function of Ω ,

featuring the respective central specular maxima symmetrically flanked by the slowly decaying diffuse scattering intensity. The latter is locally decorated with minima at conditions of high absorption ($\Omega \approx 0$ and $\Omega \approx 2\theta$) and peaks arising from multiple scattering effects (Latza et al., 2020). The solid lines superimposed to the experimental data points represent simulated Bragg sheet intensities corresponding to the best-matching parameters η and Λ in the continuum-mechanical model simultaneously describing the first and second Bragg sheets.

Two parameters can be extracted from this analysis, (1) the inter-membrane compression modulus B , and (2) the membrane bending modulus κ . The first one is a representation of the interactions between adjacent bilayers in a stack (Nagle and Tristram-Nagle, 2000). The higher the modulus B , the more strongly are the bilayers confined at a certain distance from their neighbours due to interaction forces. The second modulus κ represents the energy required to bend a membrane from planarity to some defined curvature. As all previous results, the two parameters (κ and B) are very similar for the two membrane types. Indeed, the compression modulus B is obtained as 26 MPa and 32 MPa for PG and SQDG, respectively. Because the relative humidity was not exactly the same for the two lipids during experiment, the difference can be attributed to the higher hydration for SQDG than PG. Otherwise, the values are in the same order, demonstrating once again that the short-range interactions between PG and SQDG membranes are similar. The SQDG membrane bending rigidity (modulus κ) is found to be slightly higher than for PG membranes (4.1 and 2.8 $k_B T$, respectively). The difference can only be partially attributed to the slightly higher thickness of SQDG bilayers compared to PG bilayer ($\delta d_b = 1.2$ Å), which according to classical theory of homogeneous beam would only result in a 10% difference. The remaining difference must be attributed to slightly different in-plane compressibilities of the chemically different headgroup layer.

4. Discussion

The replacement of PG by SQDG in photosynthetic membranes under phosphate starvation conditions is well known. It has been described in microorganisms, such as the purple bacteria *R. sphaeroides* (Benning et al., 1993), diatoms and cyanobacteria (Abida et al., 2015; Güler et al., 1996; Sato et al., 2000; Van Mooy et al., 2009), phytoplankton (Maat et al., 2016), but also in multicellular organisms, such as the plant model *Arabidopsis thaliana* (Essigmann et al., 1998). In photosynthetic cells, PG and SQDG are not the main lipids in chloroplast membranes, where their biosynthesis occurs, and represent respectively around 9 and 6% of chloroplast polar lipids in plants (Block et al., 2007), and in *Chlamydomonas reinhardtii* (Mendiola-Morgenthaler et al., 1985). However, *P. tricorutum* and *M. gaditana*, two secondary endosymbiont microalgae, are enriched in SQDG compared to green algae or land plants, with respectively around 20 and 11% of total lipid composition (Jouhet et al., 2017). In

diatoms, the 3D structure of thylakoids inside the chloroplast is not the same as in plant chloroplasts (Flori et al., 2017; Pysznik and Gibbs, 1992), and could be explained by the specific lipid composition.

While the galactolipid MGDG forms the hexagonal II phase, the galactolipid DGDG and the anionic lipids PG and SQDG self-organize in lamellar phase. In the thylakoids structure, the ratio of MGDG and DGDG is very important to maintain lipid bilayers (Demé et al., 2014). PG is also required for membrane organization in chloroplasts. Indeed, in PG-deficient *A. thaliana* mutants, the formation of large vesicles is induced inside the chloroplasts, leading to underdeveloped thylakoid membranes. This phenotype could be rescued in phosphate starvation conditions, where SQDG content increases (Hagio et al., 2002; Kobayashi et al., 2015). PG plays an important role in the photosynthesis activity, in particular in the electron transport (Jordan et al., 1983), in the dimerization of the photosystem II (PSII) (Kruse et al., 2000), for example. The loss of SQDG in SQDG-deficient *A. thaliana* mutant has no effect on the thylakoid architecture, but induces the PG synthesis to maintain a constant amount of total anionic lipids in membranes. However, in SQDG and PG-deficient mutant, grana stacking are reduced in *A. thaliana* leaf chloroplasts (Yoshihara et al., 2021; Yu and Benning, 2003). Altogether, it suggests that PG and SQDG are both important for photosynthetic membrane organization, which could explain why they are conserved in this membrane throughout the evolution. However, their biophysical properties are similar, suggesting that PG and SQDG should be interchangeable in phosphate starvation to maintain the thylakoid structure.

First of all, the fatty acid composition of PG and SQDG in *A. thaliana* is similar with a high amount of 18:3/16:0 or 18:3/16:1. The thickness of the diacylglycerol moiety is similar in the two lipids, leading to a similar hydrophobic bilayer thickness. In the *Figure 51.B*, the bilayer thickness of SQDG is 1.2 Å higher than that of PG. The small difference could be due to the polar head conformation. The PG head group conformation has been studied by single crystal analysis, and they showed that the phosphate group is located at ± 1.8 Å from the bilayer interface, and the charge carried by this phosphate is aligned in zigzag rows. The position of the glycerol head group attached to the phosphate group is alternatingly to the left and to the right from the phosphate rows (Pascher et al., 1987). Then, by single crystal analysis and molecular dynamics simulations, the orientation of PG polar headgroups has been found to be parallel to the membrane surface (Pascher et al., 1987; Zhao et al., 2007). However, the conformation of the polar head of SQDG has not been described. Howard and Prestegard tried to solve it by NMR and molecular modeling and concluded that the head group of membrane-bound SQDG is reminiscent of that of DGDG and MGDG, the sugar group extended away from the bilayer surface permitting maximum hydration by water molecules (Howard and Prestegard, 1996). In a previous study, Skarjune and Oldfield looked by NMR at the head group conformation of N-palmitoylglucosylceramide, that has a similar head group structure to that of SQDG. They concluded that the amplitude of fluctuations of the sugar moiety are large, always keeping the carbohydrate head group extended from

the bilayer to maximize hydrogen interactions with the bulk water (Skarjune and Oldfield, 1982). This might explain why the SQDG bilayer is slightly thicker than a bilayer of PG with the same alkyl chains.

In our results, the water layer thickness between two bilayers of PG or SQDG increases with the hydration essentially in the same way (*Figure 51.A*), the membrane thicknesses decrease with hydration in a similar way too, and both, membrane bending rigidity and the compression modulus are similar. This result suggests that the interaction forces, composed of hydration forces, electrostatic repulsion and bilayer compression forces, exerted on PG membranes are similar to that of SQDG membranes. All our results confirmed the hypothesis that SQDG is a good substitute for PG in membrane because they have similar physicochemical properties. This is not the case for all glycolipid/phospholipid replacement such as DGDG/PC as demonstrated previously (Kanduč et al., 2017).

5. Conclusions

Despite chemically different headgroups, PG and SQDG have similar physical properties with equivalent diacylglycerol backbone, equivalent bilayer and water thickness, and an equivalent response to hydration in terms of repulsion and interaction forces. The results presented here show that SQDG is a good substitute for PG in phosphate-deficiency conditions to maintain the functional organization of chloroplasts and, in turn, photosynthesis activity.

In future studies, it will be interesting to have access to the head group conformation, to understand the character of the short-range repulsive forces. A key question will be the coupling between hydration forces and short-range electrostatic interactions. In our study, lipids are isolated from their natural environment, but in the cells, electrostatic screening by counter-ions takes place under different boundary conditions. For example, divalent cations such as Mg^{2+} are required for intracellular functions (Pohland and Schneider, 2019) and influence the membrane stacking in the stroma of chloroplasts (Rumak et al., 2010). Furthermore, in plant thylakoids, PG and SQDG are necessary to keep the stacked bilayer conformation, adding repulsion forces with their negative charges (Demé et al., 2014). In algae, SQDG is more abundant than DGDG (Abida et al., 2015; Jouhet et al., 2017), and the thylakoid architecture is different from what is observed in plants (Flori et al., 2017; Pysznik and Gibbs, 1992). It would be interesting to see if these two observations are related to each other.

6. References

Abida, H., Dolch, L.-J., Meř, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M.A., Finazzi, G., Bastien, O., Tirichine, L., Bowler, C., Rébeillé, F., Petroustos, D., Jouhet, J., Maréchal, E., 2015. Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology* 167, 118–136. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252395>

- Babiychuk, E., Müller, F., Eubel, H., Braun, H.-P., Frentzen, M., Kushnir, S., 2003. *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function: *Arabidopsis phosphatidylglycerophosphate synthase 1*. *The Plant Journal* 33, 899–909. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01680.x>
- Benning, C., Beatty, A.T., Prince, R.C., Somerville, C.R., 1993. The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 1561–1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1561>
- Bishop, D.G., Kenrick, J.R., 1987. Thermal properties of 1-hexadecanoyl-2-trans-3-hexadecenoyl phosphatidylglycerol. *Phytochemistry* 26, 3065–3067. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84594-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84594-X)
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Block, M.A., Dorne, A.-J., Joyard, J., Douce, R., 1984. Preparation and Characterization of Membrane Fractions Enriched in Outer and Inner Envelope Membranes from Spinach Chloroplasts, in: Sybesma, C. (Ed.), *Advances in Photosynthesis Research*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 27–30. https://doi.org/10.1007/978-94-017-4973-2_5
- Block, M.A., Douce, R., Joyard, J., Rolland, N., 2007. Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynth Res* 92, 225–244. <https://doi.org/10.1007/s1120-007-9195-8>
- Browse, J., Kunst, L., Anderson, S., Hugly, S., Somerville, C., 1989. A Mutant of *Arabidopsis* Deficient in the Chloroplast 16:1/18:1 Desaturase. *Plant Physiol.* 90, 522–529. <https://doi.org/10.1104/pp.90.2.522>
- Burgos, A., Szymanski, J., Seiwert, B., Degenkolbe, T., Hannah, M.A., Giavalisco, P., Willmitzer, L., 2011. Analysis of short-term changes in the *Arabidopsis thaliana* glycerolipidome in response to temperature and light: *Arabidopsis* glycerolipids in abiotic stress. *The Plant Journal* 66, 656–668. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04531.x>
- Carstensen, A., Herdean, A., Schmidt, S.B., Sharma, A., Spetea, C., Pribil, M., Husted, S., 2018. The Impacts of Phosphorus Deficiency on the Photosynthetic Electron Transport Chain. *Plant Physiol.* 177, 271–284. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01624>
- Demé, B., Cataye, C., Block, M.A., Maréchal, E., Jouhet, J., 2014. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *The FASEB Journal* 11.
- Douce, R., Joyard, J., 1990. Biochemistry and Function of the Plastid Envelope. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6, 173–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.06.110190.001133>
- Dubacq, J., Tremolieres, A., 1983. Occurrence and Function of Phosphatidylglycerol Containing Delta-3-Trans-Hexadecenoic Acid in Photosynthetic Lamellae. *Physiol Veg* 21, 293–312.
- Endo, K., Kobayashi, K., Wada, H., 2016. Sulfoquinovosyldiacylglycerol has an Essential Role in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 Under Phosphate-Deficient Conditions. *Plant Cell Physiol* 57, 2461–2471. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw159>
- Essigmann, B., Güler, S., Narang, R.A., Linke, D., Benning, C., 1998. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 1950–1955. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1950>
- Fernandes, M.X., Castanho, M.A.R.B., Garcia de la Torre, J., 2002. Brownian dynamics simulation of the unsaturated lipidic molecules oleic and docosahexaenoic acid confined in a cellular membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1565, 29–35. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00501-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00501-1)
- Flori, S., Jouneau, P.-H., Bailleul, B., Gallet, B., Estrozi, L.F., Moriscot, C., Bastien, O., Eicke, S., Schober, A., Bártulos, C.R., Maréchal, E., Kroth, P.G., Petroustos, D., Zeeman, S., Breyton, C., Schoehn, G., Falconet, D., Finazzi, G., 2017. Plastid thylakoid architecture optimizes photosynthesis in diatoms. *Nat Commun* 8, 15885. <https://doi.org/10.1038/ncomms15885>
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Gonthier, J., Barrett, M.A., Aguetaz, O., Baudoin, S., Bourgeat-Lami, E., Demé, B., Grimm, N., Hauß, T., Kiefer, K., Lelièvre-Berna, E., Perkins, A., Wallacher, D., 2019. BerILL: The ultimate humidity chamber for neutron scattering. *JNR* 21, 65–76. <https://doi.org/10.3233/JNR-190109>
- Güler, S., Seeliger, A., Härtel, H., Renger, G., Benning, C., 1996. A Null Mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 Deficient in the Sulfolipid Sulfoquinovosyl Diacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* 271, 7501–7507. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7501>
- Hagio, M., Sakurai, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Wada, H., 2002. Phosphatidylglycerol is Essential for the Development of Thylakoid Membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 43, 1456–1464. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf185>
- Harroun, T.A., Katsaras, J., Wassall, S.R., 2008. Cholesterol Is Found To Reside in the Center of a Polyunsaturated Lipid Membrane. *Biochemistry* 47, 7090–7096. <https://doi.org/10.1021/bi800123b>
- Härtel, H., Peters-Kottig, M., Benning, C., 1998. The phospholipid-deficient *pho1* mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 14.
- Heinz, E., Roughan, P.G., 1983. Similarities and Differences in Lipid Metabolism of Chloroplasts Isolated from 18:3 and 16:3 Plants. *Plant Physiology* 72, 7. <https://doi.org/10.1104/pp.72.2.273>
- Howard, K.P., Prestegard, J.H., 1996. Conformation of sulfoquinovosyldiacylglycerol bound to a magnetically oriented membrane system. *Biophysical Journal* 71, 2573–2582. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79449-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79449-3)
- Hyvönen, M.T., Rantala, T.T., Ala-Korpela, M., 1997. Structure and dynamic properties of diunsaturated 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine lipid bilayer from molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal* 73, 2907–2923. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78319-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78319-X)

- Jordan, B.R., Chow, W.-S., Baker, A.J., 1983. The role of phospholipids in the molecular organisation of pea chloroplast membranes. Effect of phospholipid depletion on photosynthetic activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 725, 77–86. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(83\)90226-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(83)90226-8)
- Jouhet, J., Lupette, J., Clerc, O., Magneschi, L., Bedhomme, M., Collin, S., Roy, S., Maréchal, E., Rébeillé, F., 2017. LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: Consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. *PLoS ONE* 12, e0182423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182423>
- Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J., Block, M.A., 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* 167, 863–874. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407022>
- Joyard, J., Maréchal, E., Block, M.A., Douce, R., 1996. Plant galactolipids and sulfolipid. Structure, distribution and biosynthesis. in: *Membranes: Specialized Function in Plants*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, pp. 179–194.
- Kanduč, M., Schlaich, A., de Vries, A.H., Jouhet, J., Maréchal, E., Demé, B., Netz, R.R., Schneck, E., 2017. Tight cohesion between glycolipid membranes results from balanced water–headgroup interactions. *Nat Commun* 8, 14899. <https://doi.org/10.1038/ncomms14899>
- Kobayashi, K., 2016. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* 129, 565–580. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0827-y>
- Kobayashi, K., Endo, K., Wada, H., 2016. Roles of Lipids in Photosynthesis, in: Nakamura, Y., Li-Beisson, Y. (Eds.), *Lipids in Plant and Algae Development, Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 21–49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_2
- Kobayashi, K., Fujii, S., Sato, M., Toyooka, K., Wada, H., 2015. Specific role of phosphatidylglycerol and functional overlaps with other thylakoid lipids in *Arabidopsis* chloroplast biogenesis. *Plant Cell Rep* 34, 631–642. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1719-z>
- Kowalik, B., Schlaich, A., Kanduč, M., Schneck, E., Netz, R.R., 2017. Hydration Repulsion Difference between Ordered and Disordered Membranes Due to Cancellation of Membrane–Membrane and Water-Mediated Interactions. *J. Phys. Chem. Lett.* 8, 2869–2874. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.7b00977>
- Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G.H., Barber, J., 2000. Phosphatidylglycerol Is Involved in the Dimerization of Photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* 275, 6509–6514. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6509>
- Kučerka, N., Nieh, M.-P., Katsaras, J., 2011. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 2761–2771. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.022>
- Latza, V.M., Demé, B., Schneck, E., 2020. Membrane Adhesion via Glycolipids Occurs for Abundant Saccharide Chemistries. *Biophysical Journal* 118, 1602–1611. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.02.003>
- Lei, N., Safinya, C.R., Bruinsma, R.F., 1995. Discrete Harmonic Model for Stacked Membranes: Theory and Experiment. *J. Phys. II France* 5, 1155–1163. <https://doi.org/10.1051/jp2:1995174>
- Loosley-Millman, M.E., Rand, R.P., Parsegian, V.A., 1982. Effects of monovalent ion binding and screening on measured electrostatic forces between charged phospholipid bilayers. *Biophysical Journal* 40, 221–232. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(82\)84477-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(82)84477-9)
- López, C.A., Sovova, Z., van Eerden, F.J., de Vries, A.H., Marrink, S.J., 2013. Martini Force Field Parameters for Glycolipids. *J. Chem. Theory Comput.* 9, 1694–1708. <https://doi.org/10.1021/ct3009655>
- Maat, D.S., Bale, N.J., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., Brussaard, C.P.D., 2016. Increasing P limitation and viral infection impact lipid remodeling of the picophytoplankter <i>Micromonas pusilla</i>. *Biogeosciences* 13, 1667–1676. <https://doi.org/10.5194/bg-13-1667-2016>
- McIntosh, T.J., Magid, A.D., Simon, S.A., 1990. Interactions between charged, uncharged, and zwitterionic bilayers containing phosphatidylglycerol. *Biophysical Journal* 57, 1187–1197. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82638-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82638-2)
- Mendiola-Morgenthaler, L., Eichenberger, W., Boschetti, A., 1985. Isolation of chloroplast envelopes from *Chlamydomonas*. Lipid and polypeptide composition. *Plant Science* 41, 97–104. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90109-8)
- Müller, F., Frentzen, M., 2001. Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 509, 298–302. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03163-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03163-5)
- Murakami, H., Nobusawa, T., Hori, K., Shimojima, M., Ohta, H., 2018. Betaine Lipid Is Crucial for Adapting to Low Temperature and Phosphate Deficiency in *Nannochloropsis*. *Plant Physiol.* pp.01573.2017. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01573>
- Murata, N., Yamaya, J., 1984. Temperature-Dependent Phase Behavior of Phosphatidylglycerols from Chilling-Sensitive and Chilling-Resistant Plants. *Plant Physiol.* 74, 1016–1024. <https://doi.org/10.1104/pp.74.4.1016>
- Nagle, J.F., Tristram-Nagle, S., 2000. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1469, 159–195. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00016-2)
- Navarro-Retamal, C., Bremer, A., Ingólfsson, H.I., Alzate-Morales, J., Caballero, J., Thalhammer, A., González, W., Hincha, D.K., 2018. Folding and Lipid Composition Determine Membrane Interaction of the Disordered Protein COR15A. *Biophysical Journal* 115, 968–980. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.014>
- Pan, J., Heberle, F.A., Carmichael, J.R., Ankner, J.F., Katsaras, J., 2012. Time-of-flight Bragg scattering from aligned stacks of lipid bilayers using the Liquids Reflectometer at the Spallation Neutron Source. *J Appl Crystallogr* 45, 1219–1227. <https://doi.org/10.1107/S0021889812039945>
- Pan, J., Marquardt, D., Heberle, F.A., Kučerka, N., Katsaras, J., 2014. Revisiting the bilayer structures of fluid phase phosphatidylglycerol lipids: Accounting for exchangeable hydrogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 2966–2969. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.009>
- Parsegian, V.A., Rand, R.P., 1995. Interaction in Membrane Assemblies, in: *Handbook of Biological Physics*. Elsevier, pp. 643–690. [https://doi.org/10.1016/S1383-8121\(06\)80006-0](https://doi.org/10.1016/S1383-8121(06)80006-0)

- Pascher, I., Sundell, S., Harlos, K., Eibl, H., 1987. Conformation and packing properties of membrane lipids: The crystal structure of sodium dimyristoylphosphatidylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 896, 77–88. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(87\)90358-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(87)90358-0)
- Petrache, H.I., Dodd, S.W., Brown, M.F., 2000. Area per Lipid and Acyl Length Distributions in Fluid Phosphatidylcholines Determined by ²H NMR Spectroscopy. *Biophysical Journal* 79, 3172–3192. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76551-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76551-9)
- Pohland, A.-C., Schneider, D., 2019. Mg²⁺ homeostasis and transport in cyanobacteria – at the crossroads of bacterial and chloroplast Mg²⁺ import. *Biological Chemistry* 400, 1289–1301. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0476>
- Poirier, Y., Thoma, S., Somerville, C., Schiefelbein, J., 1991. A Mutant of *Arabidopsis* Deficient in Xylem Loading of Phosphate 97, 7.
- Pysznik, A.M., Gibbs, S.P., 1992. Immunocytochemical localization of photosystem I and the fucoxanthin-chlorophylla/c light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Protoplasma* 166, 208–217. <https://doi.org/10.1007/BF01322783>
- Rand, R.P., Parsegian, V.A., 1989. Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 988, 351–376. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(89\)90010-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(89)90010-5)
- Richard, D., Ferrand, M., Kearley, G.J., 1996. Analysis and visualisation of neutron-scattering data. *J. of Neutron Res.* 4, 33–39. <https://doi.org/10.1080/10238169608200065>
- Roughan, P.G., Holland, R., Slack, C.R., 1980. The role of chloroplasts and microsomal fractions in polar-lipid synthesis from [¹⁴C]acetate by cell-free preparations from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Biochemical Journal* 188, 17–24. <https://doi.org/10.1042/bj1880017>
- Rumak, I., Gieczewska, K., Kierdaszuk, B., Gruszecki, W.I., Mostowska, A., Mazur, R., Garstka, M., 2010. 3-D modelling of chloroplast structure under (Mg²⁺) magnesium ion treatment. Relationship between thylakoid membrane arrangement and stacking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797, 1736–1748. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.07.001>
- Salditt, T., 2005. Thermal fluctuations and stability of solid-supported lipid membranes. *J. Phys.: Condens. Matter* 17, R287–R314. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/17/6/R02>
- Salvador-Castell, M., Demé, B., Oger, P., Peters, J., 2020. Structural Characterization of an Archaeal Lipid Bilayer as a Function of Hydration and Temperature. *IJMS* 21, 1816. <https://doi.org/10.3390/ijms21051816>
- Sato, N., 2004. Roles of the acidic lipids sulfoquinovosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol in photosynthesis: their specificity and evolution. *J Plant Res* 117, 495–505. <https://doi.org/10.1007/s10265-004-0183-1>
- Sato, N., Hagio, M., Wada, H., Tsuzuki, M., 2000. Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. *Biochemical Society Transactions* 28, 912–914. <https://doi.org/10.1042/bst0280912>
- Schneck, E., Demé, B., Gege, C., Tanaka, M., 2011. Membrane Adhesion via Homophilic Saccharide-Saccharide Interactions Investigated by Neutron Scattering. *Biophysical Journal* 100, 2151–2159. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.011>
- Schneck, E., Rehfeldt, F., Oliveira, R.G., Gege, C., Demé, B., Tanaka, M., 2008. Modulation of intermembrane interaction and bending rigidity of biomembrane models via carbohydrates investigated by specular and off-specular neutron scattering. *Phys. Rev. E* 78, 061924. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.061924>
- Seddon, J.M., 1990. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1031, 1–69. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90002-T](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90002-T)
- Shahane, G., Ding, W., Palaiokostas, M., Orsi, M., 2019. Physical properties of model biological lipid bilayers: insights from all-atom molecular dynamics simulations. *J Mol Model* 25, 76. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-3964-0>
- Shimajima, M., 2011. Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. *Progress in Lipid Research* 50, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.02.003>
- Shipley, G., Green, J.P., Nichols, B.W., 1973. The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulfoquinovosyl diglycerides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 311, 531–544. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90128-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90128-4)
- Sinha, S.K., Sirota, E.B., Garoff, S., Stanley, H.B., 1988. X-ray and neutron scattering from rough surfaces. *Phys. Rev. B* 38, 2297–2311. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.38.2297>
- Skarjune, R., Oldfield, E., 1982. Physical studies of cell surface and cell membrane structure. Deuterium nuclear magnetic resonance studies of N-palmitoylglucosylceramide (cerebroside) head group structure. *Biochemistry* 21, 3154–3160. <https://doi.org/10.1021/bi00256a019>
- Stachura, S.S., Malajczuk, C.J., Kuprusevicius, E., Mancera, R.L., 2019. Influence of Bilayer Size and Number in Multi-Bilayer DOPC Simulations at Full and Low Hydration. *Langmuir* 35, 2399–2411. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03212>
- Tanoue, R., Kobayashi, M., Katayama, K., Nagata, N., Wada, H., 2014. Phosphatidylglycerol biosynthesis is required for the development of embryos and normal membrane structures of chloroplasts and mitochondria in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 588, 1680–1685. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.010>
- Thuynsma, R., Kleinert, A., Kossmann, J., Valentine, A.J., Hills, P.N., 2016. The effects of limiting phosphate on photosynthesis and growth of *Lotus japonicus*. *South African Journal of Botany* 104, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.001>
- Van Mooy, B.A.S., Fredricks, H.F., Pedler, B.E., Dyhrman, S.T., Karl, D.M., Koblížek, M., Lomas, M.W., Mincer, T.J., Moore, L.R., Moutin, T., Rappé, M.S., Webb, E.A., 2009. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* 458, 69–72. <https://doi.org/10.1038/nature07659>
- Van Mooy, B.A.S., Rocap, G., Fredricks, H.F., Evans, C.T., Devol, A.H., 2006. Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 8607–8612. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600540103>

- Wang, D., Lv, S., Jiang, P., Li, Y., 2017. Roles, Regulation, and Agricultural Application of Plant Phosphate Transporters. *Front. Plant Sci.* 8, 817. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00817>
- Wiedmann, T., Salmon, A., Wong, V., 1993. Phase behavior of mixtures of DPPC and POPG. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1167, 114–120. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(93\)90150-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(93)90150-8)
- Worcester, D.L., Franks, N.P., 1976. Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol bilayers II. Neutron diffraction. *Journal of Molecular Biology* 100, 359–378. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(76\)80068-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(76)80068-X)
- Xu, C., Yu, B., Cornish, A.J., Froehlich, J.E., Benning, C., 2006. Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3- phosphate acyltransferase. *The Plant Journal* 47, 296–309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02790.x>
- Yoshihara, A., Nagata, N., Wada, H., Kobayashi, K., 2021. Plastid Anionic Lipids Are Essential for the Development of Both Photosynthetic and Non-Photosynthetic Organs in *Arabidopsis thaliana*. *IJMS* 22, 4860. <https://doi.org/10.3390/ijms22094860>
- Yu, B., Benning, C., 2003. Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 36, 762–770. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01918.x>
- Yu, B., Xu, C., Benning, C., 2002. *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 5732–5737. <https://doi.org/10.1073/pnas.082696499>
- Zhao, W., Róg, T., Gurtovenko, A.A., Vattulainen, I., Karttunen, M., 2007. Atomic-Scale Structure and Electrostatics of Anionic Palmitoyloleoylphosphatidylglycerol Lipid Bilayers with Na⁺ Counterions. *Biophysical Journal* 92, 1114–1124. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.086272>

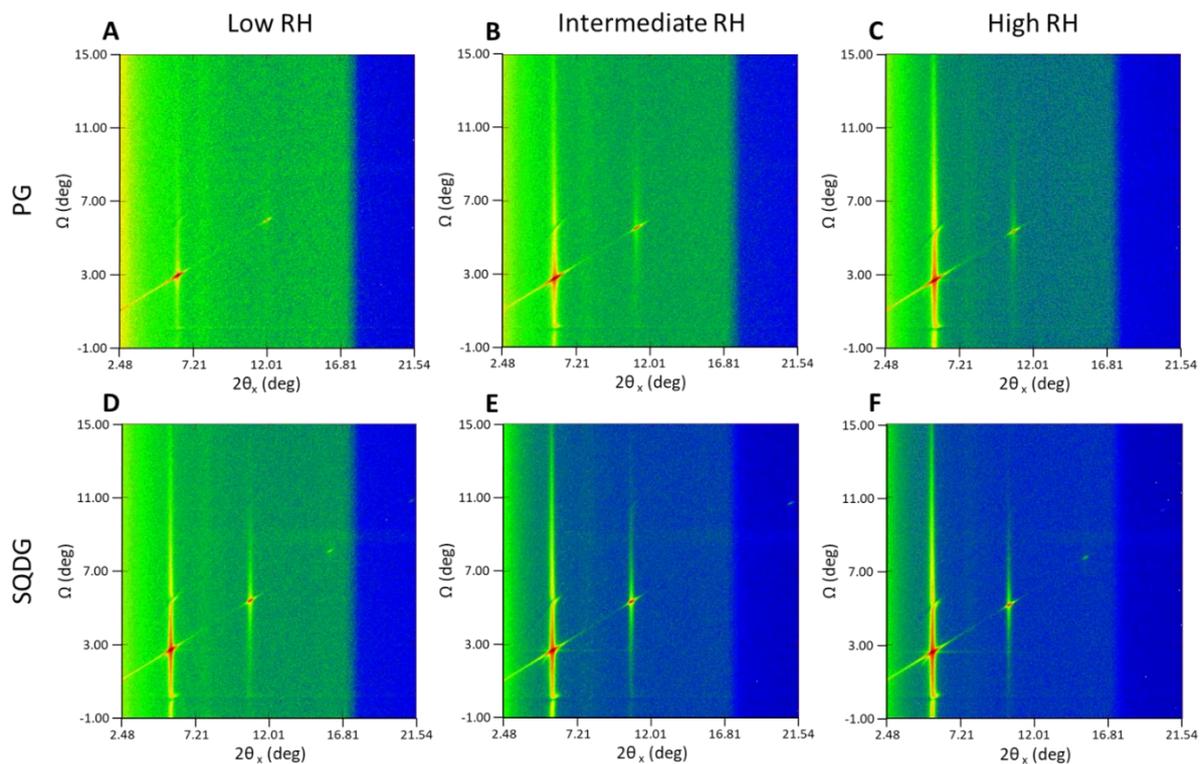


Figure S1. Diffraction scans $I(2\theta_x, \Omega)$ of PG (A-C) and SQDG (D-F) at three different humidities: low (A and D) intermediate (B and E) and high (C and F). The measures were done at 25 °C, using a 100% D₂O solvent contrast. Relative humidity values: PG 30.3, 85.3, 96.0%. SQDG 30.2, 86.0, 97.0%.

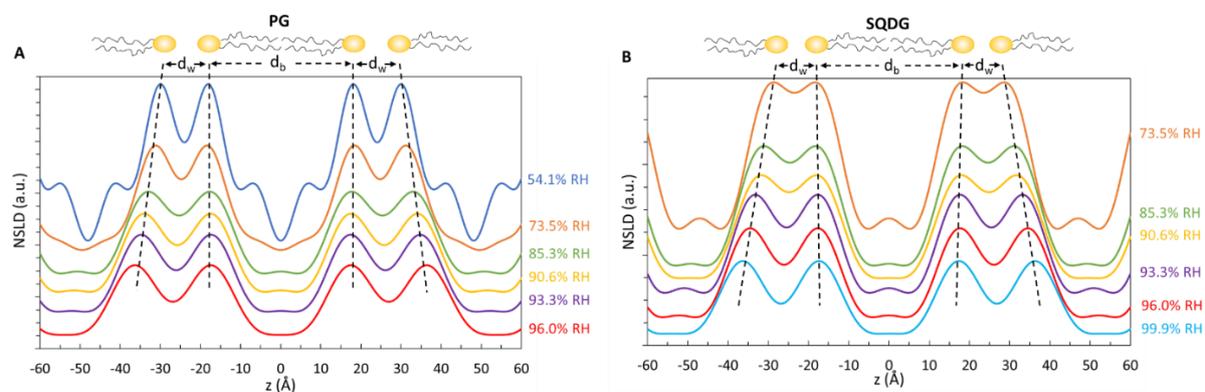


Figure S2. Neutron Scattering Length Density (NSLD) profiles of PG (A) and SQDG (B) membranes measured at 25 °C. The bilayer thickness d_b corresponds to the center-to-center distance between headgroups as described in (Nagle and Tristram-Nagle, 2000). The water layer thickness d_w is calculated with $d-d_b$, d being the lamellar period of the bilayers. On the graphs, each curve corresponds to a NSLD profile at one humidity, calculated with a minimum of 3 orders of diffraction, with the structure factor phase -, -, +, and -, -, +, - when there are 4 orders. The dotted black lines show the shift of the maxima in the NSLD profiles, showing the increase of the water layer thickness.

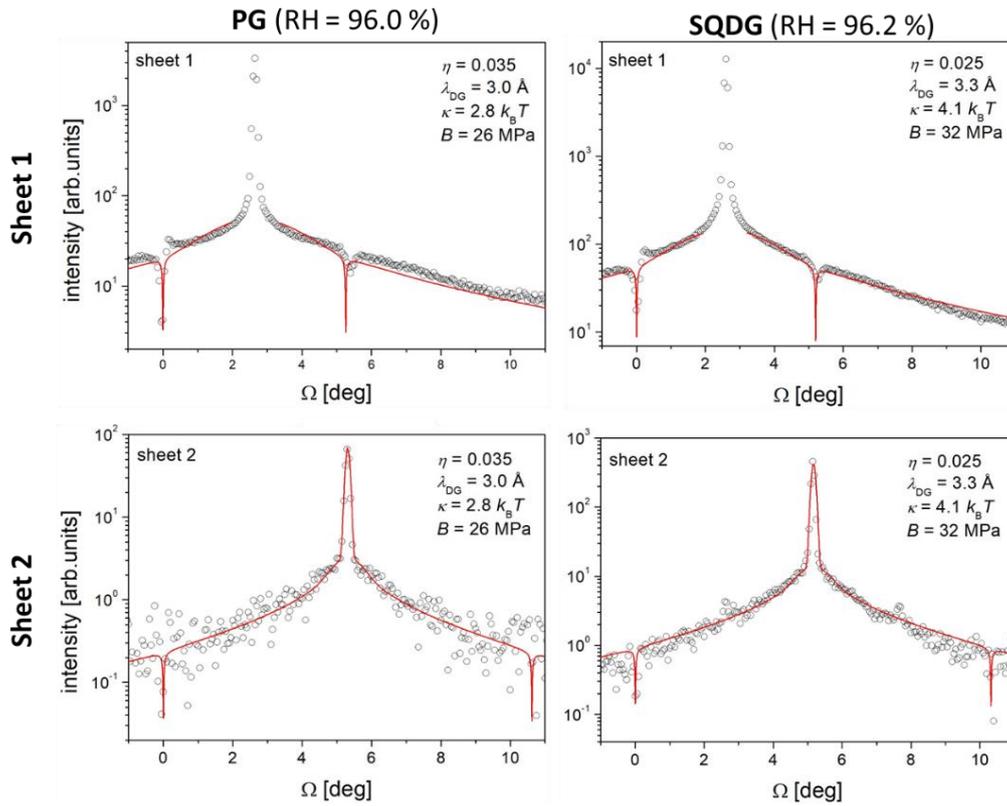


Figure S3. Intensities of the first (top) and second (bottom) Bragg sheets of PG (left) and SQDG (right) membranes at RH = 96%. In red, the best-matching model parameters for both systems are summarized: the mechanical parameters κ and B derived thereof according to Eqs.11 and 12 as described in the material and method section (Schneck et al., 2011).

Chapitre 4 :

Etude de l'architecture de l'enveloppe du chloroplaste chez les plantes supérieures en carence de phosphate

1 Préambule

Dans le chapitre précédent, il a été montré qu'en carence de phosphate, la teneur en PG de la cellule photosynthétique diminuait et était remplacé par du SQDG. Ces deux lipides semblent avoir les mêmes propriétés biophysiques, ce qui explique leur remplacement rôle pour rôle.

Chez les plantes en carence de phosphate, un autre remodelage lipidique est observé. En effet, il est également connu dans la littérature, que la teneur en DGDG dans la cellule augmente (Essigmann et al., 1998; Härtel et al., 1998; Jouhet et al., 2004). Cette augmentation de DGDG permet de faire face à une diminution de la teneur en PC. Le lien entre la PC et le DGDG a été confirmé par le transfert du squelette DAG de la PC vers le DGDG (Jouhet et al., 2003; Kelly et al., 2003). Dans des conditions normales de culture, le DGDG est synthétisé et présent essentiellement dans les membranes du chloroplaste (Block et al., 1984), alors qu'en carence en phosphate, du DGDG est également retrouvé dans les membranes extraplastidiales pour compenser le manque de phospholipides (Andersson et al., 2003) et ainsi maintenir la conformation des membranes.

Dans l'article de (Jouhet et al., 2004), les analyses lipidiques ont également montré la présence à un taux étonnamment élevé du DGDG dans les membranes de mitochondrie (jusqu'à 18 % des lipides totaux). De plus, la microscopie électronique à transmission a mis en avant des structures originales des membranes du chloroplaste, des extensions tubulaires appelées stromules (Caplan et al., 2015), et également un nombre de contacts chloroplaste-mitochondrie trois fois plus important que dans les conditions normales de croissance. Une hypothèse serait donc que le changement de composition lipidique de l'enveloppe du chloroplaste, notamment un enrichissement en DGDG, favoriserait l'extension et l'accolement des membranes, permettant d'augmenter les contacts entre les membranes, favorisant ainsi le transfert du DGDG du chloroplaste vers la mitochondrie.

Afin de valider ou réfuter cette hypothèse, des analyses en diffraction de neutrons ont été faites sur des membranes biomimétiques à partir de lipides extraits de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Les expériences ont été menées en 2015, et les données ont été analysées au cours de ce projet de thèse.

Quatre membranes biomimétiques ont été reconstituées à partir des lipides présents sur l'enveloppe du chloroplaste MGDG, DGDG, SQDG, PG et PC, avec des teneurs variables en DGDG et PC (Table 10). La première membrane utilise la composition déterminée dans la littérature (Block et al., 1984) permettant de reproduire la composition naturelle de la membrane externe du chloroplaste, nommée OEM pour *Outer Envelope Membrane*. Deux autres compositions sont réalisées, mimant les

compositions possibles de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste en carence de phosphate, avec : une composition en lipides dont la quantité de PC est nulle (OEM-PC) et une autre dont une compensation de l'absence de PC est réalisée en augmentant la teneur en DGDG (OEM-PC+DGDG), comme ce qui est observé dans les analyses lipidiques globales. En effet, si la composition des deux membranes de l'enveloppe du chloroplaste est connue chez les plantes cultivées en milieu riche en phosphate, elle reste néanmoins inconnue pour des plantes cultivées en carence en phosphate. La carence en phosphate a un effet inhibiteur sur la croissance des végétaux (Chen et al., 2018), ne permettant pas de réunir suffisamment de matériel pour la purification subcellulaire. Les différences observées entre ces deux compositions pourraient permettre de déterminer l'impact de la carence en phosphate sur les propriétés biophysiques de la membrane externe du chloroplaste. Enfin, une dernière composition de membranes a été étudiée, ne contenant pas de DGDG et une quantité plus élevée de PC (OEM-DGDG+PC). Elle permettra de valider ou non l'influence du DGDG sur l'accolement des membranes, et de voir les effets d'une augmentation de la teneur en PC sur l'architecture des membranes (Figure 52). Pour alléger la lecture de la suite du chapitre, les abréviations des membranes seront utilisées.

Table 10. Composition en lipides des membranes biomimétiques analysées en diffraction de neutrons. Les valeurs sont indiquées en proportion molaire sur la base du MGDG à 100 mol. Seules les quantités de DGDG et de PC sont modifiées, dont les couleurs indiquent visuellement si la quantité est plus ou moins forte que dans les autres membranes (respectivement plus ou moins foncé). La composition en lipides OEM est calculée à partir des données de (Block et al., 1984). **OEM** : membrane externe du chloroplaste (*Outer Envelope Membrane*), **MGDG** : monogalactosyldiacylglycérol, **DGDG** : digalactosyldiacylglycérol, **SQDG** : sulfoquinovosyldiacylglycérol, **PG** : phosphatidylglycérol, **PC** : phosphatidylcholine.

	1 Composition naturelle de l'enveloppe du chloroplaste (OEM)	2 Composition théorique en carence de phosphate (OEM - PC)	3 Composition théorique en carence de phosphate et compensation en DGDG (OEM - PC + DGDG)	4 Composition théorique en absence de DGDG (OEM - DGDG + PC)
MGDG	100	100	100	100
DGDG	170	170	358	0
SQDG	17	17	17	17
PG	17	17	17	17
PC	188	0	0	358

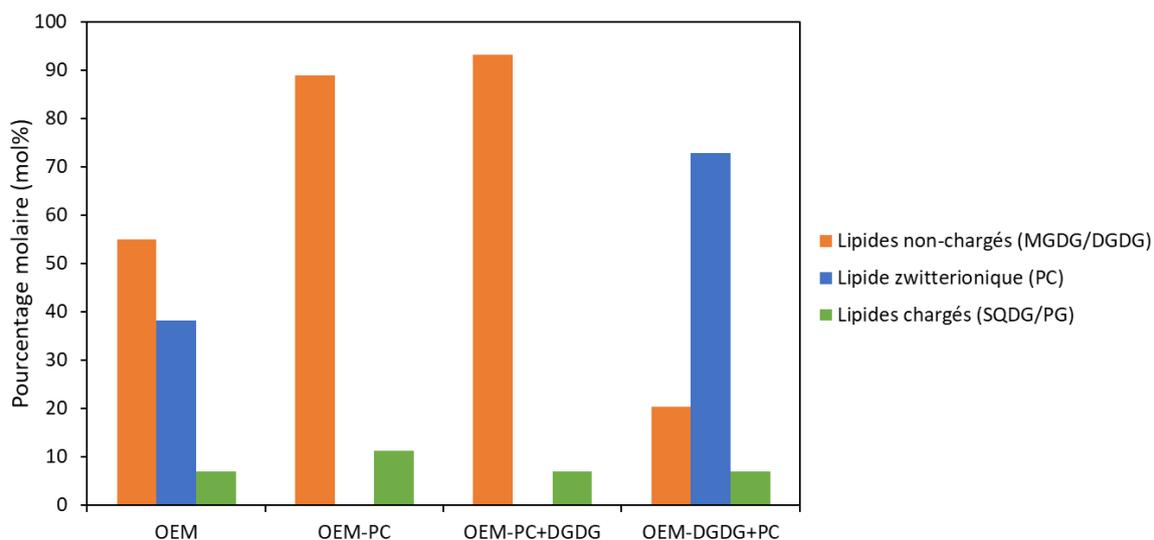


Figure 52. Pourcentage molaire (mol%) des lipides non-chargés (**orange**), zwitterionique (**bleu**) et chargés (**vert**) dans les différentes compositions étudiées. Les membranes de composition naturelle (OEM) possèdent environ 50 % de lipides non-chargés et 40 % de PC. Les membranes représentant les carences en phosphate (OEM-PC et OEM-PC+DGDG) sont composées à plus de 90 % de lipides non-chargés. L'augmentation de PC dans la composition OEM-DGDG+PC le rend majoritaire à plus de 70 %.

L'expérience de diffraction de neutrons suit la méthode utilisée dans l'article (Demé et al., 2014). Une première série de mesures en 2015 a été réalisée sur les quatre membranes, avec un contraste à 100 % D₂O, sur une large gamme d'humidité. S'agissant de lipides naturels, la température de l'échantillon a été maintenue à 25°C pour que les chaînes d'acides gras soient en phase fluide.

En 2020, une nouvelle série de mesures a été réalisée sur les membranes OEM-PC et OEM-DGDG+PC, avec un contraste à 8 % D₂O et sur seulement trois humidités, avec une température d'échantillon maintenue à 25°C. Cette expérience a permis de calculer le profil NSLD et de déterminer les épaisseurs de bicouche et de couche d'eau de ces deux membranes.

2 Résultats

DOI expérience 100 % D₂O : 10.5291/ILL-DATA.8-02-722

DOI expérience 8 % D₂O : 10.5291/ILL-DATA.TEST-3119

Les données numériques sont présentées en Annexes de ce manuscrit

2.1 Organisation des membranes

A faible humidité, où les membranes sont déshydratées, chaque composition lipidique adopte une organisation différente (*Figure 53*). Le signal de diffraction des membranes OEM, représentant la composition naturelle de l'enveloppe du chloroplaste, est très faible à RH = 40 %, et devient plus intense à 70 % d'humidité. Ce résultat pourrait traduire le fait que les membranes ne s'organisent pas en motifs répétés, et donc qu'il y ait peu ou pas de corrélations au-delà des premiers voisins. Pourtant, dans les travaux de (Demé et al., 2014), les membranes composées de MGDG/DGDG/SQDG/PG s'organisent en phase lamellaire à faible humidité. L'enveloppe du chloroplaste est composée de deux membranes dont la composition est différente. La membrane externe contient de la PC mais pas la membrane interne (Dorne et al., 1985). Or ici, dans le film de lipides, la composition de chaque membrane n'est pas contrôlée et n'est donc pas asymétrique comme elle l'est naturellement. Les conditions sont donc simplifiées par rapport aux conditions naturelles, modifiant probablement les structures des membranes dû à des quantités de lipides non respectées pour chaque membrane, en particulier la teneur en PC et DGDG. A l'inverse, les membranes OEM-PC sont bien organisées en phase lamellaire, avec deux et jusqu'à trois ordres de diffraction. L'ajout de DGDG dans la composition (OEM-PC+DGDG) semble perturber l'organisation, car même s'il s'agit d'une organisation lamellaire avec deux ordres de diffraction, deux phases en coexistence sont présentes dès les premières humidités. Comme l'échantillon est placé à 25°C, toutes les chaînes d'acides gras sont en phase fluide, ce qui permet d'écarter l'hypothèse de la coexistence des phases gel et fluide. Une autre hypothèse serait donc la présence de micro-domaines riches en DGDG, du fait de sa forte proportion dans ce mélange de lipides, ce qui modifierait l'épaisseur de la bicouche. En effet, une étude portée sur les lipides extraits du blé montre que la période d'une membrane composée de DGDG est de 54,9 Å, alors qu'elle est de 67,2 Å pour le MGDG qui s'organise en phase HII (Bottier et al., 2007). Cette différence peut donc être visible en diffraction de neutrons et pourrait être à l'origine des deux phases observées. Enfin, la diffraction des membranes sans DGDG (OEM-DGDG+PC) montre une organisation hexagonale, avant de devenir lamellaire dès 57 % d'humidité (donnée non montrée).

Ces premières analyses à faible hydratation, nous apprennent que la modélisation de la carence en phosphate par les deux hypothèses de composition lipidique (OEM-PC et OEM-PC+DGDG)

ne modifie pas l'organisation des membranes qui restent lamellaires. En revanche, les membranes sans DGDG (OEM-DGDG+PC) adoptent une organisation hexagonale, témoignant de l'importance du DGDG dans le maintien de la structure lamellaire. Ce résultat avait été mis en valeur dans l'étude de (Demé et al., 2014), où les auteurs concluent que le ratio MGDG/DGDG dans la membrane est important pour l'équilibre entre la phase hexagonale et la phase lamellaire.

A forte humidité, reflétant les conditions physiologiques où les membranes sont hydratées, les quatre compositions lipidiques s'organisent en phase lamellaire avec deux ou trois ordres de diffraction. La coexistence de deux phases, dont les périodes sont très proches (à RH = 40 %, les périodes sont mesurées à $d = 38,5 \text{ \AA}$ et $d = 41,5 \text{ \AA}$) est encore discernable dans le mélange OEM-PC+DGDG à RH = 96 %, surtout dans le deuxième ordre de diffraction, mais les premiers ordres de ces deux phases ne sont pas résolus. L'hydratation aurait donc diminué la différence de période entre le MGDG et le DGDG, visible à faible hydratation.

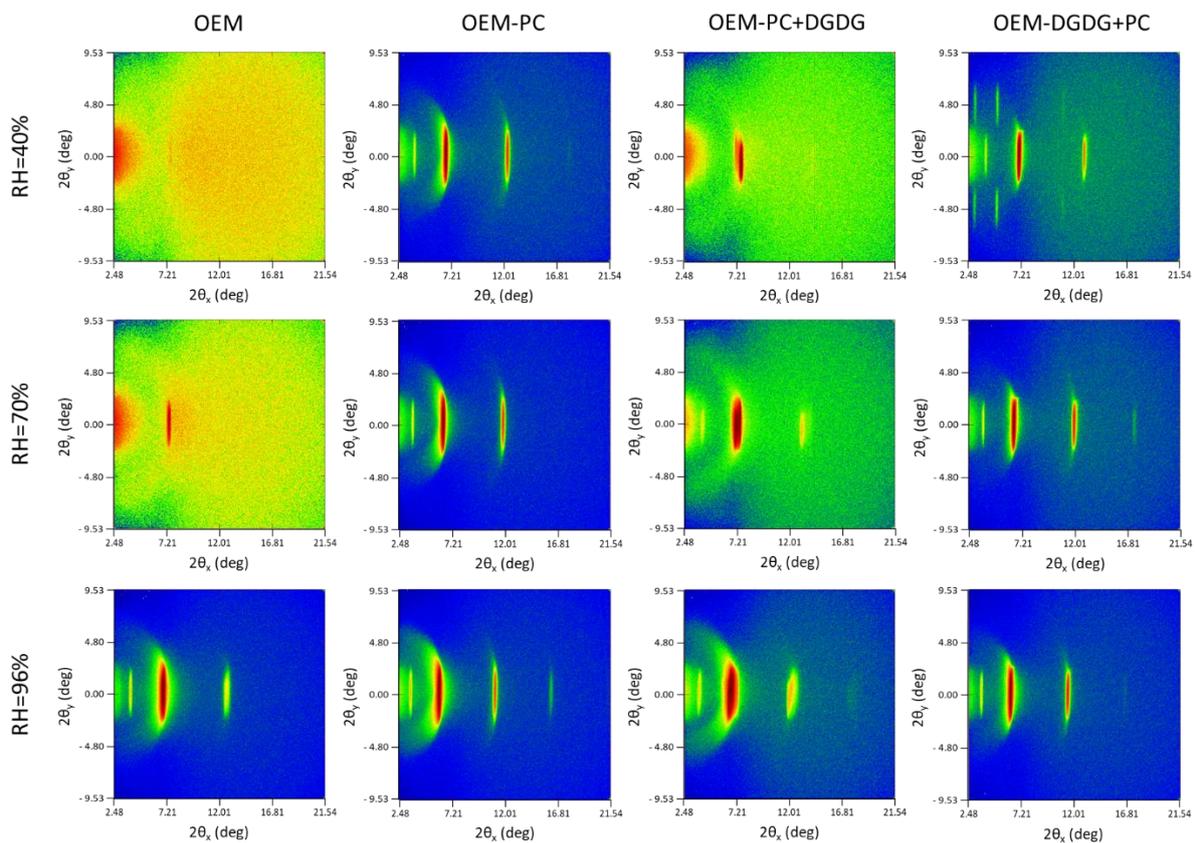


Figure 53. Images détecteur $I(2\theta_x, 2\theta_y)$ des quatre compositions étudiées pour trois humidités montrant leur organisation. Aux faibles humidités, le mélange OEM n'est pas ordonné, alors que les trois autres sont bien organisés avec deux ou trois ordres de diffraction. Le mélange OEM-PC+DGDG présente deux phases distinctes, et le mélange OEM-DGDG+PC est hexagonale. A forte humidité, les quatre compositions lipidiques s'organisent en phase lamellaire. La coexistence des deux phases dans le mélange OEM-PC+DGDG est toujours visible, mais la différence est moins marquée. Les valeurs des humidités mesurées sont : RH = 41,6, 72,5 et 96,4 % pour OEM, RH = 39,6, 70,9 et 96,3 % pour OEM-PC, RH = 39,5, 70,7 et 96,0 % pour OEM-PC+DGDG, et RH = 42,4, 73,1 et 96,5 % pour OEM-DGDG+PC. **OEM** : membrane externe du chloroplaste, composition d'après (Block et al., 1984), **PC** : phosphatidylcholine, **DGDG** : digalactosyldiacylglycérol.

2.2 Périodicité des membranes

La période d de chaque membrane est calculée selon la loi de Bragg détaillée dans le matériel et méthode. Les résultats sont présentés dans le graphique suivant (Figure 54). Le mélange OEM gonfle légèrement, avec une augmentation de la période de 4 Å, de 39,1 à 43,4 Å, respectivement de la plus faible à la plus haute humidité. En revanche, les trois autres compositions de membranes gonflent plus, avec des périodes qui augmentent d'environ 7, 9 et 10 Å respectivement pour les compositions OEM-PC, OEM-DGDG+PC et OEM-PC+DGDG.

A l'aide de la régression exponentielle des points de chaque période, il est possible de calculer la longueur de décroissance de la pression, dépendante des effets de la force d'hydratation et de la compression de membrane (Kowalik et al., 2017). La longueur de décroissance de la pression pour OEM est mesurée à $\lambda_{\text{OEM}} = 2,2$ Å, en lien avec la faible augmentation de la période vue précédemment. Les bicouches ne semblent donc pas être impactées par la force d'hydratation et la compression, d'après la définition de (Kowalik et al., 2017). La longueur de décroissance de la pression pour OEM-PC est le double de celle d'OEM, $\lambda_{\text{OEM-PC}} = 4,4$ Å, indiquant donc que les membranes gonflent avec l'hydratation. Il en est de même pour les deux autres mélanges, dont les longueurs de décroissance sont similaires à celle d'OEM-PC, mesurées à $\lambda_{\text{OEM-PC+DGDG}_1} = 6,4$ Å et $\lambda_{\text{OEM-DGDG+PC}} = 5,5$ Å. La deuxième phase du mélange OEM-PC+DGDG a une longueur de décroissance un peu plus grande ($\lambda_{\text{OEM-PC+DGDG}_2} = 9,2$ Å) que la première phase. Elle semble donc être plus répulsive que la première phase, confirmant que les deux phases ne sont probablement pas composées avec les mêmes proportions de lipides.

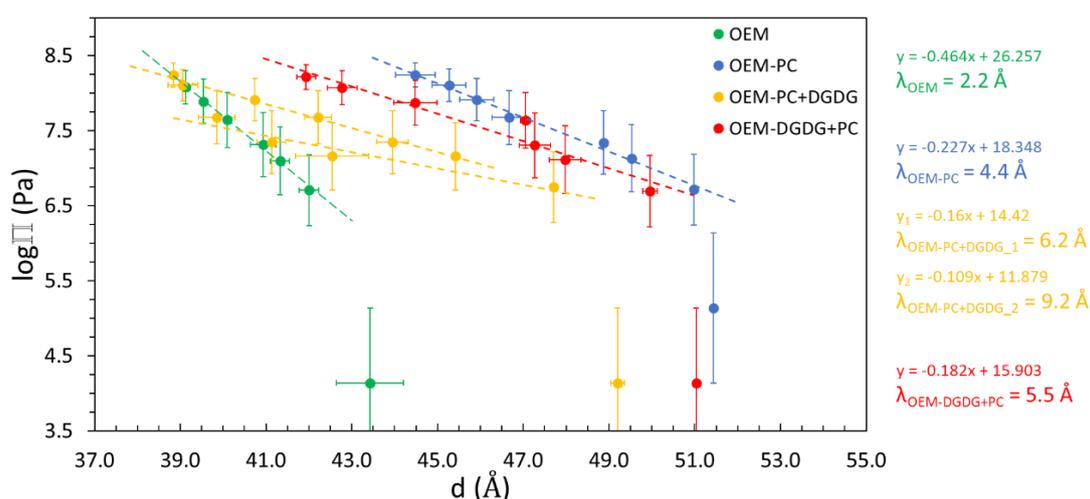


Figure 54. Comparaison de la période d des quatre mélanges lipidiques en fonction de l'hydratation. Les données sont mesurées à un contraste de 100 % D_2O , à 25°C. Avec l'augmentation de l'humidité, la composition OEM (en vert), dont la longueur de décroissance est calculée à $\lambda_{\text{OEM}} = 2,2$ Å, semble moins impactée par les forces d'hydratation et de compression des membranes que les trois autres mélanges. Les longueurs de décroissance sont similaires pour les trois autres mélanges. Les deux phases d'OEM-PC+DGDG (en jaune) ont une longueur de décroissance différente, probablement dû à une différence de composition en lipides de chacune des phases. En bleu OEM-PC, en rouge OEM-DGDG+PC. OEM : membrane externe du chloroplaste, composition d'après (Block et al., 1984), PC : phosphatidylcholine, DGDG : digalactosyldiacylglycérol.

2.3 Epaisseurs des bicouches et des couches d'eau entre membranes

Pour comprendre si les variations de longueurs de décroissance sont liées à une différence de compressibilité des membranes ou à une différence de force d'hydratation, et donc de cohésion des membranes, l'évolution des épaisseurs des membranes et des couches d'eau entre les membranes avec l'hydratation est suivie. Pour cela, la densité de neutrons (NSLD) est calculée en utilisant un solvant de contraste nul à 8 % D₂O. Le temps de faisceau étant limité, l'analyse n'a été réalisée que sur les membranes OEM-PC et OEM-DGDG+PC à seulement trois points d'humidité au milieu de la gamme.

Les deux mélanges lipidiques ont été refaits avec des lipides provenant de la même extraction que la première expérience. Du fait de l'imprécision des pipetages lors de la composition des mélanges, quelques modifications peuvent être apportées par rapport aux résultats présentés précédemment. Afin de confirmer que les résultats sont reproductibles, la périodicité des membranes est comparée aux données de 2015 (*Figure 55*). Les résultats montrent que les deux analyses, à un contraste à 100 % D₂O ou 8 % D₂O, sont semblables, avec des longueurs de décroissance similaires pour les deux compositions. Comme attendu, les deux mélanges de lipides s'organisent en phase lamellaire avec trois ordres de diffraction pour chaque humidité.

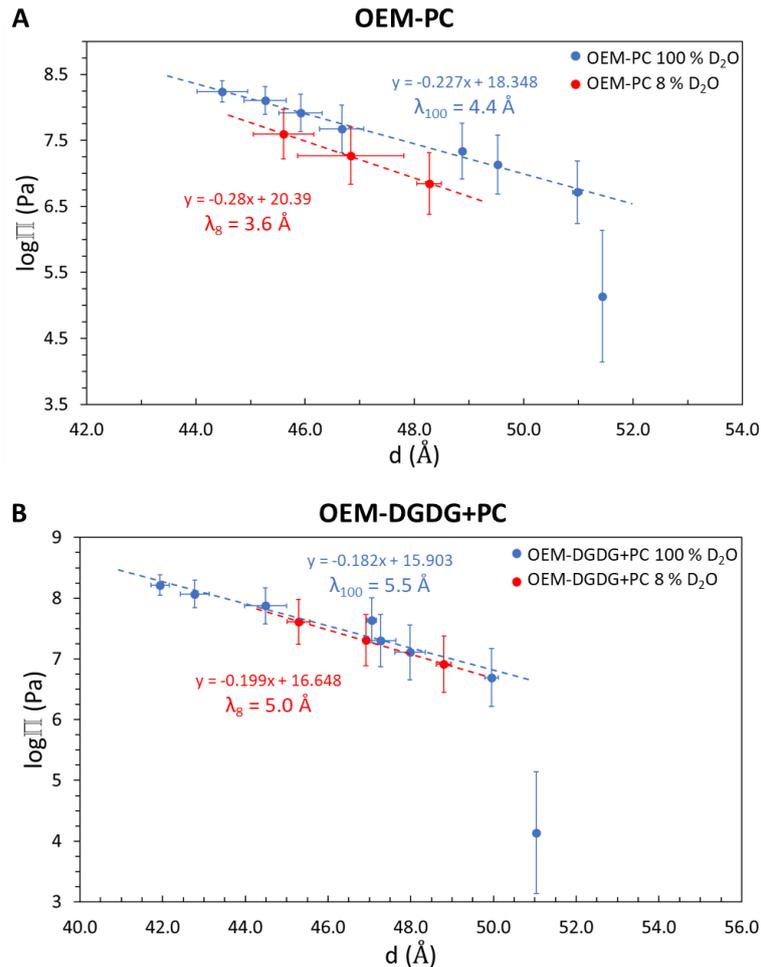


Figure 55. Comparaison des périodes des membranes OEM-PC (**en A**) et OEM-DGDG+PC (**en B**) à 100 % D₂O (**bleu**) et 8 % D₂O (**rouge**). Les deux analyses sont semblables, avec des longueurs de décroissance très similaires. **OEM** : membrane externe du chloroplaste, composition d'après (*Block et al., 1984*), **PC** : phosphatidylcholine, **DGDG** : digalactosyldiacylglycérol.

Les profils NSLD ont été calculés pour les deux mélanges pour les trois humidités (*Figure 56*). Visuellement, pour les deux compositions, l'épaisseur de la bicouche d_b ne semble pas être affectée par l'hydratation, alors que l'épaisseur de la couche d'eau d_w entre les bicouches semble augmenter légèrement. Les valeurs des épaisseurs de bicouche sont ensuite extraites numériquement par fit gaussien de chaque maximum du profil de densité, et reportées sur les graphiques en *Figure 57.A*. Les épaisseurs de couche d'eau d_w sont calculées par soustraction de l'épaisseur de la bicouche à la périodicité selon $d_w = d - d_b$, et présentées sur le graphique *Figure 57.B*. Les deux mélanges lipidiques suivent les mêmes tendances avec une légère diminution de l'épaisseur de la bicouche de moins de 3 Å, indiquant un réarrangement des têtes polaires avec l'accumulation d'eau entre les bicouches, et un gonflement de la couche d'eau d'environ 6 Å entre 75 et 94 % d'humidité. Les valeurs sont en accord avec l'étude réalisée sur les galactolipides, où l'épaisseur de la membrane MGDG/DGDG/SQDG/PG à une pression de 7,0 Pa est de 12 Å (*Demé et al., 2014*).

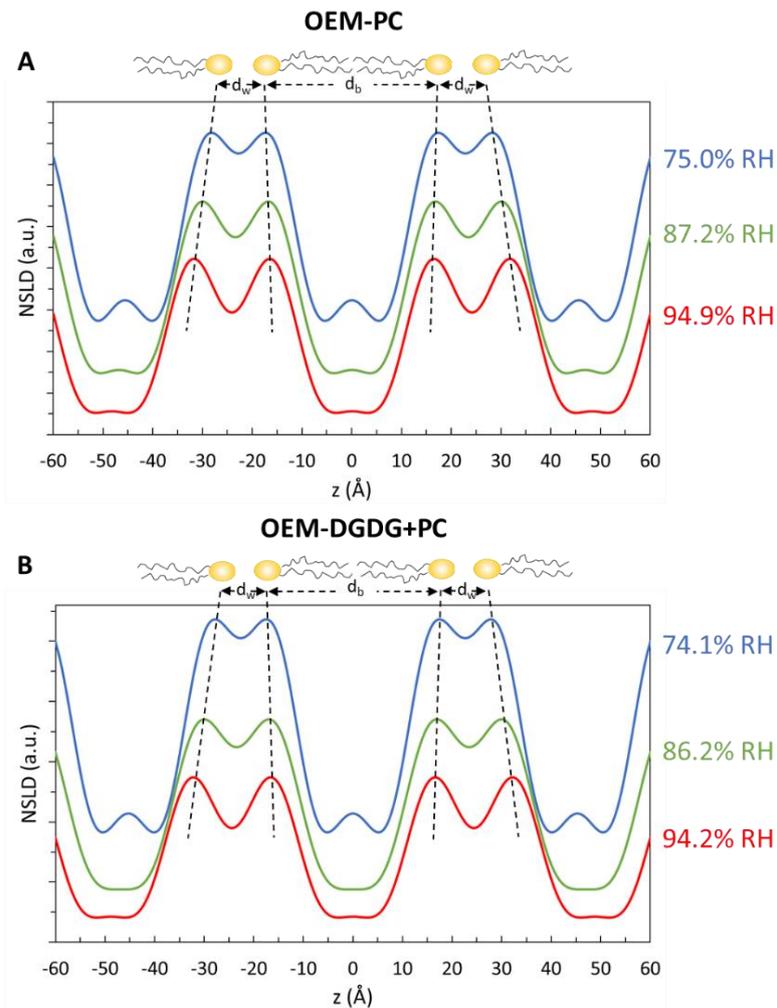


Figure 56. Profils de densité des neutrons (NSLD) des compositions OEM-PC (A) et OEM-DGDG+PC (B), mesurées à 25°C, à un contraste 8 % D₂O. Les profils sont calculés avec 3 ordres de diffraction pour les 3 humidités. L'épaisseur de la bicouche d_b correspond à la distance tête-tête autour de $z = 0$, comme décrit dans (Nagle and Tristram-Nagle, 2000). L'épaisseur de la couche d'eau est calculée par $d_w = d - d_b$, avec d la période lamellaire. Les pointillés noirs montrent le décalage du maximum entre les profils NSLD, indiquant la tendance de l'évolution des épaisseurs d_b et d_w avec l'hydratation. **OEM** : membrane externe du chloroplaste, composition d'après (Block et al., 1984), **PC** : phosphatidylcholine, **DGDG** : digalactosyldiacylglycérol.

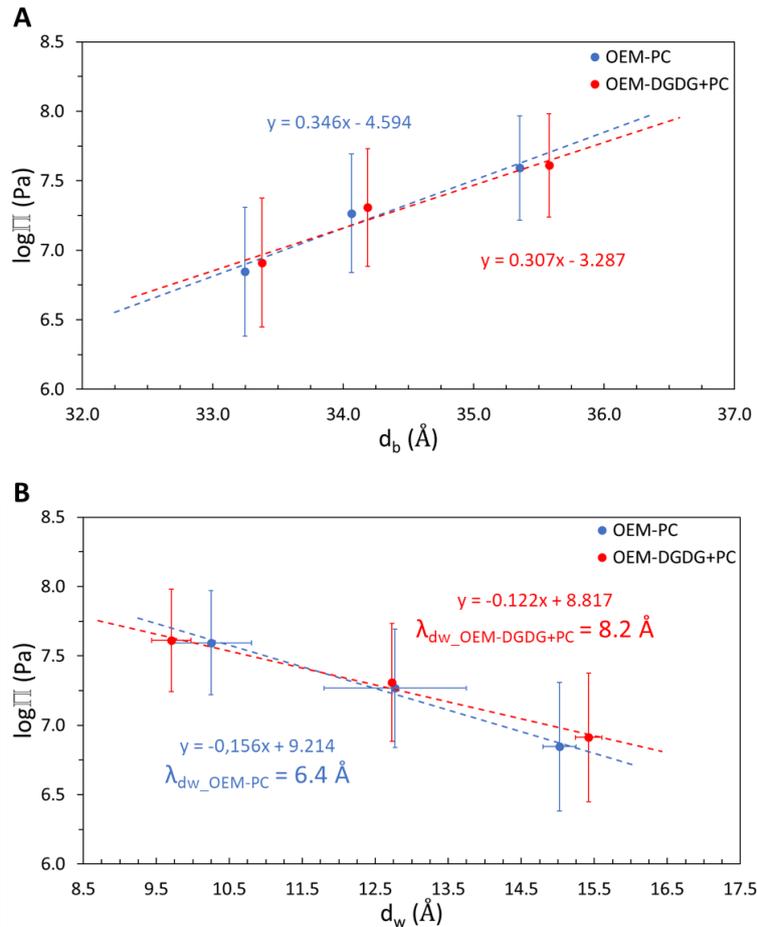


Figure 57. Epaisseurs de la bicouche d_b (A) et de la couche d'eau d_w (B) en fonction de l'hydratation pour les compositions OEM-PC (bleu) et OEM-DGDG+PC (rouge). Les mesures ont été faites à 25°C. OEM : membrane externe du chloroplaste, composition d'après (Block et al., 1984), PC : phosphatidylcholine, DGDG : digalactosyldiacylglycérol.

La longueur de décroissance de la pression renseigne sur les forces d'hydratation exercées sur les membranes. Les longueurs de décroissance de la pression sont du même ordre avec $\lambda_{dw_OEM-PC} = 6,4 \text{ \AA}$ pour OEM-PC, et $\lambda_{dw_OEM-DGDG+PC} = 8,2 \text{ \AA}$ pour OEM-DGDG+PC. Ces valeurs sont en accord avec les longueurs de décroissance calculées à partir de la période d (Figure 55), où λ_{OEM-PC} est plus petite que $\lambda_{OEM-DGDG+PC}$, respectivement 4,4 et 5,5 Å. D'après ces résultats, les forces d'hydratation exercées sur les membranes OEM-PC semblent avoir moins d'impacts que pour les membranes OEM-DGDG+PC, dont les longueurs de décroissance sont légèrement plus grandes. Le SQDG et le PG dont la tête polaire est chargée négativement, sont responsables de la répulsion électrostatique des membranes et donc de l'augmentation de d_w avec l'hydratation (Demé et al., 2014). La différence observée entre les deux mélanges se joue donc sur les effets du DGDG et de la PC, dont les quantités sont modifiées. Alors que l'épaisseur d'eau, au maximum de l'hydratation, entre deux bicouches de DGDG est mesurée jusqu'à 10 Å (Demé et al., 2014), elle est mesurée à 27 et 29 Å respectivement pour une membrane de DOPC et DMPC (Costigan et al., 2000). Kanduč et al. ont montré que les membranes de DGDG sont six fois

plus cohésives que des membranes de PC (Kanduč et al., 2017). Dans nos compositions, les distances entre les membranes (d_w) du mélange OEM-PC sont plus petites à forte hydratation que celles du mélange OEM-DGDG+PC. Ainsi, les résultats sont en accord avec les données de la littérature et la conclusion faite par (Demé et al., 2014) dans leur étude, à savoir confirmer la force cohésive du DGDG dans les membranes, permettant de les maintenir en contact lors d'une forte hydratation par rapport à des membranes qui n'en contiennent pas. Comme l'analyse n'a été réalisée que sur trois points d'humidité, les résultats restent à confirmer sur une plus grande gamme d'humidité.

2.4 Rigidité des membranes

Grâce à l'intensité et au profil du second pic de Bragg sur les scans de diffractions $I(2\theta_x, \Omega)$, il est possible de déterminer la rigidité d'une membrane. Deux paramètres peuvent être extraits des données : (1) le module de compressibilité inter-membranaire B , représentant les interactions entre les bicouches adjacentes dans un empilement (Nagle and Tristram-Nagle, 2000), plus la valeur du module B est grand, plus les interactions entre les membranes sont fortes (Scheu et al., 2021), et (2) la rigidité de courbure κ de la membrane, représentant l'énergie requise pour déformer une membrane de sa courbure naturelle à une autre courbure. Les analyses ont été réalisées en collaboration avec Emmanuel Schneck de l'*Institute of Condensed Matter Physics*, Darmstadt, Allemagne. Les données présentées en *Figure 58* ont été calculées à l'humidité la plus élevée, proche de 100 %, pour les mélanges de lipides OEM, OEM-PC et OEM-DGDG+PC. La présence des deux phases dans la membrane OEM-PC+DGDG rend la mesure de la diffusion latérale difficile, car les pics de Bragg ne sont pas bien résolus.

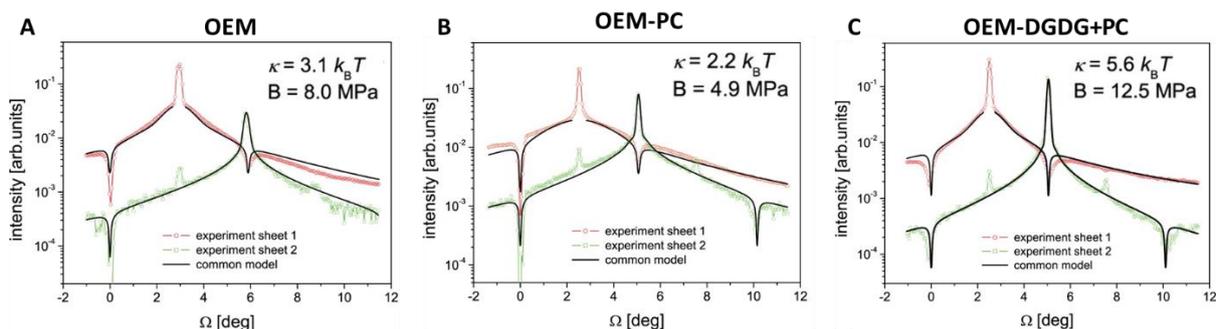


Figure 58. Calculs des paramètres de rigidité de membranes avec κ , le module de flexion des membranes et B , le module de compression inter-membranes. Plus le module κ est élevé, plus les membranes sont rigides. Plus le module B est élevé, plus les interactions entre les membranes sont fortes. Les membranes OEM-DGDG+PC sont plus rigides ($\kappa = 5,6 k_B T$) que les membranes OEM ($\kappa = 3,1 k_B T$), elles-mêmes plus rigides que les membranes OEM-PC ($\kappa = 2,2 k_B T$). Les interactions sont plus fortes dans les membranes OEM-DGDG+PC ($B = 12,5 \text{ MPa}$) que dans les deux autres. **OEM** : membrane externe du chloroplaste, composition d'après (Block et al., 1984), **PC** : phosphatidylcholine, **DGDG** : digalactosyldiacylglycérol.

Les valeurs du module κ sont du même ordre pour deux des trois mélanges étudiés, OEM et OEM-PC, avec $\kappa_{\text{OEM}} = 3,1 k_B T$, $\kappa_{\text{OEM-PC}} = 2,2 k_B T$. En revanche, les membranes OEM-DGDG+PC semblent légèrement plus rigides avec $\kappa_{\text{OEM-DGDG+PC}} = 5,6 k_B T$. Ce résultat semble donc en faveur de l'hypothèse du projet, à savoir que le DGDG apporte de la souplesse aux membranes leur permettant de se déformer. Mais avec seulement ces données, il est impossible de dire avec certitudes si la rigidité des membranes provient de l'absence du DGDG seul ou d'un effet synergique de l'absence du DGDG et de l'augmentation de PC. Pour pouvoir confirmer ces résultats, il faudrait réaliser une nouvelle fois cette expérience avec des compositions de membrane intermédiaires.

Les résultats concernant la compressibilité des membranes à travers le module B donnent les résultats suivants, $B_{\text{OEM}} = 8,0 \text{ MPa}$, $B_{\text{OEM-PC}} = 4,9 \text{ MPa}$ et $B_{\text{OEM-DGDG+PC}} = 12,5 \text{ MPa}$, suggérant que les interactions répulsives entre les membranes de composition OEM-DGDG+PC sont plus fortes que pour les deux autres compositions. La diffraction de neutrons a montré que les distances entre les membranes (d_w) sont très similaires (*Figure 54, Figure 57*), et les longueurs de décroissance de la pression suggéraient également que les membranes OEM-DGDG+PC étaient légèrement plus impactées par l'hydratation que les membranes OEM-PC, suggérant également le comportement répulsif des membranes OEM-DGDG+PC. En revanche, les analyses du module B n'ont pas été réalisées à la même humidité pour les trois compositions lipidiques. Comme ce module dépend de l'hydratation des membranes, il est impossible d'interpréter les résultats obtenus. Il est donc nécessaire de refaire l'expérience à des humidités identiques, permettant de suivre les interactions des membranes.

3 Conclusion et perspectives

Ce projet avait pour but de confirmer les résultats de l'étude (Demé et al., 2014) et également de comprendre les observations microscopiques réalisées dans l'article (Jouhet et al., 2004). Dans les conditions normales de culture, le DGDG est un lipide synthétisé dans les membranes du chloroplaste, dont il est l'un des constituants majoritaires avec le MGDG (Block et al., 1984). Or, chez les plantes en carence de phosphate, la quantité de DGDG augmente significativement, et une quantité non négligeable est également retrouvée dans la composition des membranes des mitochondries. De plus, le nombre de contacts entre les chloroplastes et les mitochondries est triplé, avec l'apparition de structures particulières appelées stromules, correspondant à une extension de l'enveloppe du chloroplaste. L'hypothèse de travail était donc que l'augmentation du DGDG dans la cellule favoriserait la formation des stromules, permettant le transfert du DGDG du chloroplaste vers la mitochondrie via les sites de contact, afin de stabiliser les membranes en remplaçant les phospholipides, dont la quantité diminue lors de la carence.

Pour répondre à cette question, quatre membranes de composition différente ont été étudiées par diffraction de neutrons, permettant d'avoir accès à leur organisation et leurs propriétés physicochimiques. Le mélange OEM représente la composition de la membrane externe du chloroplaste d'*Arabidopsis thaliana* dans des conditions normales de culture (Block et al., 1984), sans tenir compte de la composition asymétrique des deux feuillettes. Deux hypothèses de composition des membranes en carence de phosphate ont été réalisées, l'une en supprimant seulement la quantité de PC (OEM-PC), et l'autre en remplaçant la quantité de PC par une quantité équivalente en DGDG (OEM-PC+DGDG), car dans les membranes en carence de phosphate, une partie de la PC est remplacée par du DGDG (Jouhet et al., 2004). Enfin, pour améliorer notre compréhension des galactolipides, un film de membranes dont la quantité de DGDG est remplacée par de la PC est formé, pour savoir si à lui seul le MGDG pouvait favoriser la juxtaposition des membranes. Les résultats obtenus dans ce projet n'ont pas été ceux escomptés initialement, et ne nous permettent de répondre au problème posé. En effet, en comparant l'évolution de la période des quatre compositions de lipides, alors qu'on supposait que le DGDG favorisait l'accolement des membranes, les mélanges OEM-PC et OEM-PC+DGDG, dont la teneur en DGDG est plus forte, ont une période plus grande que les membranes OEM. De plus, la présence des deux phases en coexistence dans le mélange OEM-PC+DGDG ne facilite pas son interprétation. Enfin, les longueurs de décroissance calculées à partir des périodes, dont les valeurs semblent aller à l'encontre des résultats attendus, ne sont pas en accord avec les longueurs de décroissance calculées à partir des épaisseurs de couche d'eau. Ainsi, les incertitudes sont trop nombreuses pour pouvoir tirer des conclusions précises sur le rôle du DGDG dans les différentes compositions de lipides étudiées. Il est possible que ce soit le ratio PC/DGDG qui soit important pour les membranes, car en carence de phosphate, la quantité de PC n'est pas totalement nulle. Pour comprendre l'apport de chacun des deux lipides dans les propriétés de la membrane, des membranes biomimétiques dont la quantité de PC et de DGDG varie progressivement pourraient être analysées.

Au niveau de la plante, dans des double mutants KO des enzymes de synthèse du DGDG, *dgd1dgd2*, les observations réalisées au microscope électronique à transmission montrent que l'ultrastructure des chloroplastes est modifiée avec l'apparition de larges zones sans thylakoïdes (Hölzl et al., 2009), suggérant bien que le DGDG est indispensable à l'architecture des thylakoïdes. Dans cette même publication, les auteurs ne se sont pas intéressés aux contacts entre le chloroplaste et les autres organites, ce qui serait intéressant de suivre dans ce double mutant en présence et en absence de phosphate. Enfin, pour terminer cette analyse, il serait nécessaire de réaliser la diffraction de neutrons sur une large gamme d'humidité, en particulier aux fortes hydratations, pour comprendre les propriétés des membranes et des lipides.

Discussion générale et perspectives du projet

De plus en plus le monde fait face à une prise de conscience écologique à la recherche de nouvelles solutions pour limiter l'impact de l'Homme sur la planète. Le remplacement du pétrole, dont les réserves commencent à diminuer drastiquement, constitue l'un des axes principaux dans le changement vers des énergies plus vertes. De nombreuses firmes se tournent vers les microalgues, des producteurs importants de lipides, montrant un intérêt pour la fabrication de biocarburants. Des études tentent d'augmenter la teneur en lipides dans les microalgues. Malheureusement, nouvelles sur le marché de la recherche, les microalgues restent encore très peu caractérisées. C'est pourquoi, des recherches fondamentales sur le métabolisme des microalgues sont nécessaires pour permettre d'accroître les connaissances sur ces organismes et déterminer les leviers importants pour répondre à la demande des industriels. Dans ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à la compréhension du rôle des lipides dans l'architecture des membranes.

En effet, dans les plantes, la composition en lipides des différents compartiments cellulaires est connue. Alors que les galactolipides (MGDG/DGDG/SQDG) sont les composants majoritaires des membranes des chloroplastes (Block et al., 1984), les phospholipides (PC/PG/PE/PI/PS) constituent principalement les membranes extra-plastidiales. Les analyses lipidiques ont montré que les microalgues étaient également composées de ces lipides majeurs (Jouhet et al., 2017). Par analogie avec les plantes supérieures, il est supposé que dans tous les organismes photosynthétiques (cyanobactéries, microalgues), contenant également les mêmes galactolipides, la répartition des lipides dans la cellule soit similaire. En revanche, la présence de lipides particuliers dans les microalgues est également notée, comme par exemple les bêtaines lipides (Sato, 1992) et l'ASQD (Abida et al., 2015; Riekhof et al., 2003), dont les synthèses et la localisation subcellulaire sont inconnues. De plus, la composition en acides gras des microalgues offre une très grande diversité de longueurs de chaînes et d'insaturations que ne proposent pas les plantes. Alors que les plantes sont composées essentiellement d'acides gras en C16 et C18 avec au maximum 3 insaturations, les microalgues sont capables de synthétiser des acides gras à 24 carbones avec jusqu'à 6 insaturations. La présence de l'EPA (20:5) et du DHA (22:6), tous deux de la famille des oméga-3, font des microalgues une source intéressante pour la nutrition (Calder, 2015). Les questions qui se posent alors sont : (1) quel est le rôle de ces lipides exotiques dans les membranes et le bénéfice pour la microalgue ? (2) comment des acides gras aussi longs et insaturés peuvent s'organiser dans une membrane ?

Un premier élément de réponse peut être apporté en étudiant la réaction des microalgues vis-à-vis d'une carence de phosphate. En effet, chez les plantes carencées, il est connu que les quantités de phospholipides dans la cellule diminuent, remplacées par des lipides non-phosphorés (Essigmann et al., 1998; Härtel et al., 1998; Jouhet et al., 2004). La diminution des lipides phosphorés permet à la cellule de remobiliser le phosphate des lipides pour d'autres mécanismes importants pour sa survie

(Wang et al., 2019; Wu et al., 2003). Chez les microalgues, une remobilisation similaire des lipides est observée (Abida et al., 2015; Hildebrand et al., 2012; Liang et al., 2019). La quantité de bêtaines lipides et d'ASQD augmentent pour faire face à la carence. Ainsi, ces lipides semblent participer au maintien de la structure des membranes. L'objectif du projet de thèse était donc de comprendre les propriétés des lipides permettant d'expliquer leur interchangeabilité au cours de la carence en phosphate. L'étude a été divisée en deux parties, d'un côté les lipides des microalgues, et de l'autre les lipides de plante. Trois modèles d'études ont été utilisés : deux microalgues brunes, *Phaeodactylum tricornutum* (diatomée) et *Microchloropsis gaditana* (eustigmatophyte), et une plante supérieure *Arabidopsis thaliana* (angiosperme).

1 Rôle des bêtaines lipides dans le remplacement de la phosphatidylcholine des membranes des microalgues

Dans cette première partie du projet de thèse, nous nous sommes concentrés sur l'architecture des membranes de bêtaines lipides. En effet, le fait que les bêtaines lipides soient présents dans les microalgues, les algues, les mousses et les fougères (Künzler et al., 1997), mais absents dans les plantes à graines, nous a interpellé. Est-ce que ce lipide a été perdu dans l'évolution à cause de sa redondance avec un autre lipide non-phosphoré ? Est-ce que ces lipides ont des propriétés particulières incompatibles avec l'architecture des membranes de plantes ? Autant de questions que nous avons essayé d'élucider dans ce projet pour enrichir les connaissances sur les bêtaines lipides encore manquantes dans la littérature.

Les données bibliographiques ont permis de déterminer la présence de trois bêtaines lipides, le DGTA, le DGTS et le DGCC, répartis dans des organismes différents. Par exemple, le DGTA est retrouvé chez *Phaeodactylum tricornutum* (Cañavate et al., 2016), le DGTS chez *Microchloropsis gaditana* et *Chlamydomonas reinhardtii* (Kalisch et al., 2016; Sakurai et al., 2014), et le DGCC chez les Haptophyceae (Kato et al., 1996). Il est intéressant de noter que chez les algues vertes, la présence de bêtaines lipides en grande quantité est souvent synonyme de faible quantité voire d'absence de PC (Kalisch et al., 2016; Sato, 1992). En revanche, seule la synthèse du DGTS est connue (Murakami et al., 2018). La localisation dans les compartiments cellulaires est inconnue. La structure moléculaire des bêtaines lipides étant très proche de celle de la PC (*Figure 9*), l'hypothèse serait que leur localisation soit identique. De plus, en carence de phosphate, la quantité de bêtaines lipides augmente dans la cellule alors que la quantité de PC diminue (Murakami et al., 2018). Ainsi, ces données semblent montrer que les bêtaines lipides peuvent remplacer la PC lors d'une carence en phosphate. C'est sur cette hypothèse que nous nous sommes penchées dans ce projet.

La comparaison des lipides synthétiques DPPC et DP-DGTS, portant les mêmes longueurs de chaînes d'acides gras, a montré que les propriétés de la tête polaire du DP-DGTS n'étaient pas identiques à celles de la DPPC (*Chapitre 1. Section 3*). En effet, alors que les membranes de ces deux lipides ont montré une organisation lamellaire, leurs propriétés physiques sont très différentes. Par rapport à la DPPC, le DP-DGTS a une bicouche plus épaisse, plus rigide et plus répulsive. La diminution de l'épaisseur de la bicouche du DP-DGTS lors de la déshydratation nous a permis d'apporter une réponse à l'absence de bêtaines lipides chez les plantes à graines. En effet, les plantes sont soumises à des changements de pression osmotique importants, tantôt soumises à des épisodes de sécheresse, tantôt hydratées. De plus, la graine comporte une étape de forte dessiccation lors de sa formation. Deux indices qui montrent l'incompatibilité des bêtaines lipides avec la présence de graines, à cause des variations d'épaisseur des membranes trop importantes. La question que l'on pourrait se poser maintenant est comment les microalgues réussissent à composer avec la présence de bêtaines lipides dans leur membrane ? Les microalgues évoluent dans un milieu en excès d'eau, leur pression osmotique est donc régie par la différence de potentiel entre le milieu extérieur et l'intérieur de la cellule, ce qui permet l'entrée ou la sortie des ions. Les microalgues possèdent des mécanismes particuliers appelés mécanocapteurs (Kefauver et al., 2020) leur permettant de faire rentrer ou sortir de l'eau de la cellule, afin de maintenir une pression osmotique constante. Ainsi, les membranes sont moins impactées par les différences d'hydratation comme elles peuvent l'être dans les plantes soumis à des épisodes de sécheresse. Ainsi, l'épaisseur de la bicouche de DGTS reste quasiment constante. De plus, les analyses de la composition lipidique des microalgues révèlent que le DGTS de *Microchloropsis gaditana* et le DGTA de *Phaeodactylum tricornutum* sont composés d'acides gras à très longues chaînes polyinsaturées (PUFA) (*Chapitre 1. Section 2*) (Abida et al., 2015; Cañavate et al., 2016). Les PUFA, grâce aux nombreuses insaturations, peuvent se replier réduisant ainsi leur longueur (Fernandes et al., 2002). Cela montre donc qu'un changement de tête polaire sur un lipide, entraînant des propriétés de membranes différentes, est souvent accompagné d'un changement de composition d'acides gras, afin de compenser les effets et maintenir une bicouche stable et similaire qu'elles que soient les conditions environnementales. Des analyses complémentaires par diffraction des neutrons sur des DGTS portant différentes longueurs d'acide gras, pourraient apporter des réponses plus précises sur le rôle des PUFA dans le DGTS. Une comparaison avec le DGTA serait également intéressante, mais elle nécessite une synthèse chimique de ce lipide car il n'est pas commercialisé.

Chez les plantes, comme indiqué précédemment, la composition en acides gras est limitée aux C16 et C18 portant jusqu'à trois insaturations. Pour confirmer l'hypothèse évolutive déterminée dans notre étude par les analyses biophysiques, il serait donc intéressant de revenir à une étude *in vivo* exprimant le gène de la DGTS synthase chez la plante. Ainsi, l'effet de l'incorporation du DGTS dans les

membranes pourra être suivi. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la PC peut être remplacée par du DGTS sans impact majeur sur la croissance cellulaire (Riekhof et al., 2014). La coexistence de la PC et du DGTS dans une membrane de cellule de plante serait donc un problème. En plaçant les plantes modifiées en carence de phosphate, la quantité de PC serait diminuée, permettant au DGTS de le remplacer. L'interchangeabilité de la PC et du DGTS pourra être étudiée par des analyses phénotypiques et microscopiques par l'observation de la structure des membranes. S'il est possible de faire exprimer du DGTS dans une plante seulement en carence en phosphate, cela permettrait à cette dernière de remobiliser le phosphate des phospholipides et de pouvoir résister à la carence.

Afin d'affiner la compréhension des bêtaines lipides chez les microalgues, des mutants KO pour l'enzyme de synthèse des bêtaines lipides étaient initialement prévus dans ce projet de thèse. Un parallèle entre les microalgues *Phaeodactylum tricornutum* et *Microchloropsis gaditana* devait être réalisé. Malheureusement, l'obtention de mutants étant un processus de longue durée et le confinement dû à la pandémie de COVID-19 étant survenu lors de la deuxième année de thèse, seules des transformations chez *Microchloropsis gaditana* ont été réalisées au cours de ce projet. Malgré une vingtaine de transformations réalisées, aucune des colonies obtenues ne s'est révélée positive. De même, des mutants KO de la PEAMT (enzyme impliquée dans la synthèse de la PC) devaient être produits pour suivre la remobilisation lipidique en l'absence de ce lipide majoritaire des membranes extra-plastidiales. En revanche, il a été noté que les transformations ciblées sur ce gène donnaient très peu de colonies résistantes, ce qui laisse supposer que l'absence de PC dans les membranes soit létale pour la microalgue. Son absence pourrait entraîner une déstructuration de ces dernières et donc à la mort cellulaire. Nous avons également projeté de faire pousser des microalgues dans des conditions de dessiccation, en les plaçant sur milieu gélosé nutritif, mais en laissant les boîtes sécher sous hotte pendant un temps défini. Le tapis cellulaire serait ensuite prélevé, et des analyses de la composition en lipides et en acides gras seraient réalisées. Dans des conditions de dessiccation, nous avons vu par diffraction de neutrons, que la bicouche du DP-DGTS s'affine. L'hypothèse serait alors d'observer une modification de la composition en acides gras chez la microalgue pour pallier à cet amincissement. Soit le DGTS sera majoritairement composé de courtes chaînes d'acides gras, ou alors riche en PUFA, des acides gras capables de se replier grâce aux nombreuses insaturations.

Enfin, une recherche de la voie de synthèse du DGTA serait un point crucial pour la connaissance du métabolisme des microalgues. En effet, chez *Phaeodactylum tricornutum*, une DGTS synthase a été identifiée, mais pourtant seul du DGTA est présent dans la composition lipidique. Il est donc possible qu'une carboxylase soit présente, permettant de produire du DGTA à partir du DGTS en déplaçant le groupement carboxyl. Ainsi, le DGTS serait produit mais ne serait qu'un intermédiaire pour la synthèse du DGTA et ne serait donc pas détectable. L'idée est de rechercher une carboxylase

qui serait surexprimée en carence de phosphate, avant de pouvoir la muter et vérifier si elle est bien liée à la synthèse du DGTA. On pourrait également faire exprimer la DGTS synthase de *Phaeodactylum tricornutum* chez *Microchloropsis gaditana* et vérifier si la synthèse du DGTS chez cette dernière est toujours possible.

2 Organisation des lipides exotiques des microalgues

Les microalgues possèdent des lipides exotiques par rapport aux plantes (*Chapitre 2*). En effet, comme indiqué précédemment, elles possèdent des acides gras à très longues chaînes polyinsaturées, comme la PC 20:5/20:5. Nous nous sommes donc intéressés à l'organisation de ces membranes composées de PUFA (*Chapitre 2. Section 2*). En effet, au vu de l'encombrement des acides gras par rapport à la tête polaire, il est possible que ces lipides favorisent la courbure de la membrane localement, et s'organisent en phase hexagonale. Nous avons donc étudié la PC 22:6/22:6 commercialisée, comme substitut à son homologue 20:5. Mais cette étude n'a pas été concluante. Il semblerait que, hydraté, ce lipide ne soit pas capable de s'organiser en phase structurée, formant alors une phase amorphe, car le signal de diffraction a disparu dès les humidités intermédiaires. De plus, à la fin de l'expérience, les lipides semblaient être dégradés par oxydation au contact de l'oxygène de l'air.

Afin de déterminer l'organisation de ces lipides, un mélange de PC 18:3/18:3 par exemple, avec une quantité croissante de PC 22:6/22:6 peut être testée par diffraction de neutrons avec un contraste 8 % D₂O permettant de déterminer les épaisseurs de membranes et de couches d'eau. La PC 18:3/18:3 a déjà été étudiée et les paramètres sont connus (Patrick Williams et al., 1996). Ainsi, en connaissant le comportement de ce lipide seul et en rajoutant la PC 22:6/22:6, l'impact des PUFA sur l'organisation et les propriétés des membranes seront observées, car les têtes polaires sont identiques. La levure *Saccharomyces cerevisiae* ne produit que des acides gras C16 et C18 avec seulement 1 insaturation. Dans une étude, les auteurs ont fait exprimer des désaturases, permettant d'obtenir des acides gras 18:2 et 18:3, conférant à la levure une tolérance au pH alcalin (Yazawa et al., 2009). Ainsi, s'il est possible de faire exprimer des acides gras plus longs et insaturés chez la levure, cela nous permettrait de suivre la structure des membranes en microscopie.

Dans une deuxième étude, nous nous sommes intéressés à l'organisation du troisième acide gras estérifié sur la tête polaire de l'ASQD (*Chapitre 2. Section 3*). En effet, ce lipide est présent en très faible quantité dans certaines microalgues, comme *Phaeodactylum tricornutum* (Abida et al., 2015) et

Chlamydomonas reinhardtii (Riekhof et al., 2003), mais son rôle n'a jamais été étudié. De plus, sa synthèse et sa localisation sont inconnues. Du fait de sa ressemblance avec le SQDG, l'ASQD est probablement localisé dans le chloroplaste et sa synthèse est réalisée à partir du SQDG. Une mutation KO de l'enzyme de synthèse du SQDG entraîne également l'absence d'ASQD (Riekhof et al., 2003). Une hypothèse formulée sur le rôle de l'ASQD dans les membranes serait que ce lipide servirait au rapprochement des membranes. En effet, la structure des thylakoïdes de *Phaeodactylum tricornutum* (Flori et al., 2017; Pysznik and Gibbs, 1992) est différente de celle des thylakoïdes d'*Arabidopsis thaliana* (Daum and Kuhlbrandt, 2011). Le troisième acide gras présent sur la tête polaire de l'ASQD serait donc capable de s'ancrer dans une membrane adjacente permettant la juxtaposition des deux bicouches. Pour valider cette hypothèse, nous avons étudié par diffraction des neutrons, le comportement des membranes sans et avec ASQD. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas suffi pour conclure et valider cette hypothèse. En effet, la période d des trois mélanges, mesurée à un contraste de 100 % D₂O est identique, alors que l'analyse avec un contraste à 8 % D₂O semble montrer une différence dans la répulsion des membranes. Malheureusement, comme cette dernière analyse n'a été faite que sur une petite gamme d'humidité, cela ne nous permet pas de valider ou réfuter l'hypothèse avec certitude. Pour cela, il est donc nécessaire de réaliser à nouveau cette expérience sur une gamme plus large et en particulier aux fortes hydratations pour visualiser l'effet de la présence d'ASQD dans les membranes. Ensuite pour accentuer l'effet, une étude par SANS pourrait être faite sur des liposomes multilamellaires de taille identique, avec ou sans ASQD et le gonflement maximal des membranes pourrait être déterminé.

Ensuite, d'un point de vue biologique, il serait intéressant de connaître les étapes de synthèse de l'ASQD, et surtout l'enzyme responsable de l'estérification du troisième acide gras. Cette enzyme a-t-elle une préférence de substrat, choisissant spécifiquement l'acide gras le plus long et le plus insaturé de l'organisme ? Ainsi, connaissant cette enzyme, il serait possible de réaliser des mutations sur cette enzyme et suivre l'impact sur la production d'ASQD et l'organisation des membranes. De plus, il serait possible d'exprimer cette enzyme dans des organismes ne possédant pas d'ASQD pour voir si sa synthèse est possible.

3 L'interchangeabilité du PG et du SQDG chez *Arabidopsis thaliana*

Dans la deuxième partie de ce projet de thèse, centrée sur les lipides d'*Arabidopsis thaliana*, il était question de savoir si le SQDG était un bon substitut au PG lors d'une carence en phosphate (*Chapitre 3*). En effet, dans la littérature, de nombreuses études sur la carence en phosphate chez les

plantes et les microalgues notent la synthèse du SQDG pour remplacer la PG (Benning et al., 1993; Essigmann et al., 1998; Murakami et al., 2018; Sato, 2004; Shimojima, 2011; Yu and Benning, 2003). En revanche, les propriétés physicochimiques de ces deux lipides n'ont jamais été étudiées et aucune preuve n'a été formulée montrant que l'interchangeabilité du PG et du SQDG ne modifiait pas l'architecture des membranes. C'est pourquoi dans cette étude nous avons étudié des membranes simples composées uniquement de PG et de SQDG, pour dans un premier temps, connaître les propriétés de chaque lipide. Les résultats ont permis de conclure que ces deux lipides ont des propriétés très similaires permettant de conserver une membrane stable et fonctionnelle pour la photosynthèse. Il serait maintenant intéressant d'étudier des membranes complexes avec des ratios de PG/SQDG différents pour suivre le comportement des lipides en présence d'autres lipides dont les propriétés sont différentes. Ensuite, pour comprendre l'importance du SQDG dans la structure des membranes du chloroplaste, une étude devait être réalisée chez les microalgues. Des mutants KO pour l'enzyme de synthèse du PG et du SQDG devait être faite indépendamment chez *Microchloropsis gaditana* par recombinaison homologue. Une étude comparative entre des conditions normales de culture et des conditions carencées en phosphate devait également être réalisée à la suite de ces mutations. Ainsi, comment les microalgues cultivées sans carence auraient-elles composé avec l'absence de PG dans les membranes ? Est-ce qu'une synthèse des phospholipides aurait été constatée ? Ou bien une synthèse de SQDG ? De même, en carence de phosphate chez des microalgues sans SQDG, comment serait-il remplacé pour maintenir l'architecture des membranes ? Est-ce qu'une synthèse des galactolipides ou des bêtaines lipides sera observée ? Des questions qui restent encore non élucidées à ce jour mais qui permettront d'apporter des connaissances supplémentaires sur le rôle et l'importance du PG et du SQDG dans l'architecture des membranes.

4 Rôle du DGDG dans la déformation de l'enveloppe du chloroplaste

En carence de phosphate, la quantité de DGDG augmente pour compenser la diminution des phospholipides (Essigmann et al., 1998; Härtel et al., 1998; Jouhet et al., 2004). De plus, l'augmentation de la teneur en DGDG dans les mitochondries semble corrélée à l'augmentation du nombre de contacts entre les deux organites (Jouhet et al., 2004). Ainsi, l'augmentation du DGDG et/ou la diminution de la PC dans l'enveloppe du chloroplaste favorise-t-elle sa déformation permettant le transfert du DGDG vers d'autres membranes ? Pour répondre à cette question, différentes membranes dont la composition mime l'enveloppe du chloroplaste en carence de phosphate ont été étudiées par diffraction des neutrons. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas suffisants pour nous permettre

de conclure sur le rôle du DGDG dans l'accolement des membranes (*Chapitre 4*). En effet, le chloroplaste des plantes est entouré par deux membranes dont la composition est différente, de même que chaque feuillet de chaque membrane. Certains phospholipides (PC, PG) sont présents dans le feuillet externe de la membrane externe mais pas dans les feuillets internes (Block et al., 1984), modifiant les propriétés de chaque demi-membrane vis-à-vis de la demi-membrane adjacente. Or dans notre étude, nous n'avons pas pu prendre en compte cette asymétrie, le modèle membranaire ne reflétant donc pas exactement les conditions réelles.

Une expérience pourrait être réalisée pour modéliser la compressibilité latérale des membranes par la formation de monocouches dans une cuve de Langmuir. Ainsi, l'étude de la composition du feuillet externe et du feuillet interne de la membrane externe pourra être faite indépendamment, pouvant apporter des réponses sur le rôle des lipides dans l'extension de l'enveloppe du chloroplaste. Il est également possible de former des bicouches supportées asymétriques avec des compositions différentes pour chaque feuillet par la technique de Langmuir-Blodgett. S'il est possible de réaliser des vésicules asymétriques pour mimer les conditions réelles, il serait intéressant d'étudier le gonflement maximal par SANS, en comparant des vésicules sans et avec DGDG. Ainsi, si le gonflement maximal est plus grand pour les vésicules ne contenant pas de DGDG, cela montrerait que ce lipide favorise la juxtaposition des membranes. La levure *Saccharomyces cerevisiae*, ne possédant pas de chloroplaste, ne contient pas de DGDG dans sa composition lipidique, mais principalement des phospholipides et des sphingolipides (Lindberg et al., 2013). En ajoutant l'enzyme de synthèse du DGDG par modification génétique, elle permettrait la production du DGDG par la levure et permettrait ensuite d'observer par microscopie les modifications dans l'architecture des membranes. Cela permettrait donc de confirmer si le DGDG favorise le rapprochement et la déformation des membranes.

En résumé, ce projet de thèse nous a permis d'obtenir des informations importantes sur les propriétés des lipides et des membranes grâce à l'utilisation de la diffraction des neutrons. Ces résultats permettent d'augmenter les connaissances fondamentales sur le rôle des lipides dans les membranes des microalgues et les plantes cultivées en carence de phosphate. Les observations du remodelage de la composition lipidique des membranes en carence de phosphate ont pu être confirmées par une approche biophysique. Certaines hypothèses n'ont pas pu être résolues durant ce projet de thèse, mais les premiers résultats obtenus sont prometteurs et appellent à ce qu'on s'y intéresse dans de nouvelles études.

5 Perspectives d'étude des lipides par une approche biochimique

Comme expliqué précédemment, le projet comportait initialement une partie biologique/biochimique avec la formation de mutant KO pour des enzymes de synthèse de lipides chez les microalgues. Un parallèle entre les microalgues *Phaeodactylum tricornutum* et *Microchloropsis gaditana* était également prévu. L'obtention de mutants étant un processus de longue durée et le confinement dû à la pandémie de COVID-19 étant survenu lors de la deuxième année de thèse, seules des transformations chez *Microchloropsis gaditana* ont été réalisées au cours de ce projet, mais ne générant malheureusement aucun mutant souhaité, malgré une vingtaine de transformations pour chaque gène ciblé.

Le but était de cibler les gènes des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides étudiés par diffraction des neutrons, à savoir la PC, le DGTS, le PG et le SQDG, comme expliqué dans le matériel et méthode. Si les mutants avaient été validés par PCR et séquençage, la suite aurait été de les comparer avec une souche sauvage pour valider l'absence des lipides ciblés par extraction et analyse de leur composition lipidique, puis contrôler les paramètres de croissance et d'activité photosynthétique, ainsi que la structure de leurs membranes par microscopie électronique. Le tout aurait été réalisé sur des algues cultivées dans des conditions normales de croissance, mais également en carence de phosphate. Ainsi, les observations obtenues avec les neutrons auraient pu être confirmées par des observations *in vivo*. La poursuite de ce travail fait l'objet d'un nouveau projet de thèse.

Annexes

Annexes du chapitre 1 :

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd
24.9	298.1	30.1	0.156	8.2	0.163	41.9	0.000
25.0	298.1	59.9	0.302	7.8	0.306	44.6	0.375
25.0	298.2	74.5	0.367	7.6	0.371	46.2	0.348
25.0	298.2	84.2	0.416	7.4	0.419	47.0	0.357
24.9	298.0	91.8	0.449	7.1	0.452	47.9	0.418
24.8	297.9	96.1	0.474	6.7	0.476	48.9	0.644
24.5	297.7	99.4	0.486	5.9	0.488	49.7	0.499
24.5	297.7	99.9	0.494	5.1	0.497	51.9	0.207
25.0	298.2	100.0	0.482	4.1	0.484	53.4	0.088

Annexe 1 : Tableau des données obtenues pour le film de PC extrait de *Phaeodactylum tricornutum* mesuré à un contraste à 100 % D₂O, à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période.

	T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd
Phase 1	24.9	298.0	30.2	0.155	8.2	0.163	41.1	0.000
	25.0	298.1	60.0	0.302	7.8	0.306	43.1	0.000
	25.0	298.1	74.6	0.368	7.6	0.371	45.4	0.385
	25.0	298.1	84.3	0.416	7.4	0.419	46.9	0.405
	25.0	298.2	91.0	0.445	7.1	0.448	48.0	0.675
	25.0	298.2	94.9	0.461	6.9	0.464	49.0	0.593
	25.0	298.2	97.3	0.474	6.6	0.476	49.9	1.110
	25.0	298.2	98.7	0.482	6.3	0.484	50.8	0.746
	25.0	298.2	100.0	0.482	4.1	0.484	56.1	1.450
Phase 2	25.0	298.2	94.9	0.461	6.9	0.464	52.5	
	25.0	298.2	97.3	0.474	6.6	0.476	54.8	
	25.0	298.2	98.7	0.482	6.3	0.484	56.1	
	25.0	298.2	100.0	0.482	4.1	0.484	70.6	

Annexe 2 : Tableau des données obtenues pour le film de DGTA extrait de *Phaeodactylum tricornutum* mesuré à un contraste à 100 % D₂O, à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période.

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd
24.5	297.7	30.2	0.160	8.2	0.167	42.0	0.000
24.6	297.7	60.6	0.302	7.8	0.306	43.9	0.324
24.6	297.8	75.5	0.376	7.6	0.379	45.5	0.249
24.6	297.8	85.6	0.421	7.3	0.423	48.5	0.088
24.6	297.8	92.5	0.457	7.0	0.460	50.1	0.088
24.7	297.8	96.4	0.469	6.7	0.472	50.8	0.141
24.7	297.8	98.9	0.482	6.2	0.484	51.3	0.029
24.7	297.8	100.0	0.490	4.1	0.492	51.9	0.237
24.9	298.1	100.0	0.490	4.1	0.492	52.3	1.030

Annexe 3 : Tableau des données obtenues pour le film de DGTS extrait de *Microchloropsis gaditana* mesuré à un contraste à 100 % D₂O, à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période.

	T (°C)	T (K)	RH (%)	δ RH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd
Gel phase	49.7	322.8	20.3	0.095	8.4	0.107	57.4	0.101
	49.7	322.9	49.8	0.212	8.0	0.218	57.5	0.047
	49.8	322.9	74.6	0.306	7.6	0.310	58.0	0.002
	49.8	322.9	84.5	0.347	7.4	0.351	57.8	0.701
Fluid phase	49.8	323.0	84.5	0.347	7.4	0.351	54.0	0.041
	49.8	322.9	91.5	0.376	7.1	0.379	54.2	0.009
	49.8	323.0	95.5	0.392	6.8	0.395	54.4	0.055
	49.8	323.0	98.0	0.400	6.5	0.403	54.9	0.222
	49.8	323.0	99.6	0.404	5.8	0.407	55.4	0.054
	49.8	323.0	99.5	0.404	5.9	0.407	56.7	0.017

	T (°C)	T (K)	RH (%)	δ RH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd	d_b (Å)	d_w (Å)	δd_w
Gel phase	50.4	323.5	30.2	0.135	8.3	0.144	57.1	0.134	42.9	14.2	0.134
	50.4	323.6	53.3	0.225	8.0	0.230	57.5	0.050	42.1	15.4	0.050
	50.5	323.6	73.0	0.302	7.7	0.306	58.0	0.128			
Ripple phase?	50.5	323.6	73.0	0.302	7.7	0.306	56.2	0.445			
Fluid phase	50.5	323.6	73.0	0.302	7.7	0.306	53.3	0.179			
	50.5	323.6	84.9	0.351	7.4	0.355	53.1	0.075	37.2	15.9	0.075
	50.5	323.6	90.2	0.372	7.2	0.375	53.2	0.062	36.5	16.7	0.062
	50.5	323.6	93.0	0.380	7.0	0.383	53.4	0.038	36.0	17.4	0.038
	50.5	323.6	95.8	0.388	6.8	0.391	54.2	0.112	35.3	18.9	0.112
	50.2	323.4	98.3	0.400	6.4	0.403	56.6	0.201	35.7	20.9	0.201

Annexe 4 : Tableaux des données obtenues pour le film DPPC mesuré à un contraste à 100 % D₂O (**en haut**) et à 8 % D₂O (**en bas**), à 50°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, **Π** : la pression osmotique, **d** : la période, **d_b** : l'épaisseur de la bicouche, **d_w** : l'épaisseur de la couche d'eau.

	T (°C)	T (K)	RH (%)	δ RH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd
Gel phase	48.3	321.4	20.4	0.095	8.4	0.107	60.3	0.070
	48.8	322.0	41.7	0.184	8.1	0.191	61.9	0.123
	49.1	322.2	61.6	0.261	7.9	0.266	63.2	0.082
	49.2	322.3	76.2	0.319	7.6	0.322	63.7	0.036
	49.3	322.4	85.9	0.355	7.4	0.359	64.5	0.032
	49.3	322.5	92.7	0.380	7.1	0.383	65.9	0.051
Fluid phase	49.2	322.3	76.2	0.319	7.6	0.322	51.8	0.653
	49.3	322.4	85.9	0.355	7.4	0.359	54.0	0.378
	49.3	322.5	92.7	0.380	7.1	0.383	55.8	0.884
	49.4	322.5	96.6	0.396	6.7	0.399	72.4	0.084
	49.4	322.5	99.0	0.404	6.2	0.407	71.9	0.123
	49.4	322.6	99.4	0.404	6.0	0.407	78.0	0.775

	T (°C)	T (K)	RH (%)	δ RH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd	d_b (Å)	d_w (Å)	δd_w
Gel phase	49.0	322.2	32.2	0.139	8.2	0.148	60.5	0.396	45.0	15.5	0.396
	49.6	322.7	55.7	0.237	7.9	0.242	62.7	0.071	45.0	17.7	0.071
	49.8	322.9	75.3	0.314	7.6	0.318	65.0	0.269	44.5	20.5	0.269
	49.9	323.0	87.1	0.355	7.3	0.359	67.0	0.293	44.9	22.2	0.293
	49.9	323.1	92.4	0.380	7.1	0.383	69.0	0.226	45.0	24.1	0.226
	49.9	323.1	95.1	0.388	6.9	0.391	71.6	0.075	47.0	24.6	0.075
Fluid phase	49.6	322.7	55.7	0.237	7.9	0.242	51.5	0.056			
	49.8	322.9	75.3	0.314	7.6	0.318	56.4	0.378	37.7	18.7	0.378
	49.9	323.0	87.1	0.355	7.3	0.359	58.7	0.707	37.9	20.8	0.707
	49.9	323.1	92.4	0.380	7.1	0.383	62.0	0.343	38.7	23.4	0.343
	49.9	323.1	95.1	0.388	6.9	0.391	65.9	0.044	40.2	25.8	0.044
	50.0	323.1	97.9	0.400	6.5	0.403	71.5	0.017	45.7	25.8	0.017
	49.9	323.0	99.4	0.408	6.0	0.411	72.2	0.077	45.7	26.6	0.077

Annexe 5 : Tableaux des données obtenues pour le film DP-DGTS mesuré à un contraste à 100 % D₂O (**en haut**) et à 8 % D₂O (**en bas**), à 50°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période, **d_b** : l'épaisseur de la bicouche, **d_w** : l'épaisseur de la couche d'eau.

DPPC				DP-DGTS			
RH (%)	Bragg order h	Gel phase	Fluid phase	RH (%)	Bragg order h	Gel phase	Fluid phase
30.2	1	- 41.777		32.2	1	- 40.735	
	2				2	- 2.714	
	3	14.645			3	15.354	
	4	- 17.877			4	- 14.456	
53.3	1	- 39.388		55.7	1	- 39.857	
	2	- 5.981			2	- 6.562	
	3	20.136			3	17.924	
	4	- 18.558			4	- 13.174	
84.9	1		- 35.041	75.3	5	- 3.068	
	2		- 14.939		1	- 33.622	- 11.714
	3		19.560		2	- 11.265	- 5.892
	4		- 8.078		3	16.558	3.290
90.2	1		- 33.206	87.1	4	- 7.287	
	2		- 17.634		5	- 4.722	
	3		19.045		1	- 24.941	- 17.019
	4		- 5.383		2	- 11.267	- 11.357
93.0	1		- 31.943	92.4	3	11.884	4.359
	2		- 19.470		4	- 3.868	
	3		18.428		5	- 3.582	
	4		- 3.608		1	- 19.200	- 17.451
95.8	1		- 30.155	95.1	2	- 13.066	- 14.574
	2		- 21.273		3	9.464	3.322
	3		17.180		1	- 21.366	- 17.930
98.3	1		- 25.262	97.9	2	- 12.880	- 13.618
	2		- 24.339		3	8.187	
	3		13.133		1		- 17.424
				99.4	2		- 14.228
					3		7.417
					1		- 14.628
					2		- 13.347
					3		6.621

Annexe 6 : Tableaux des facteurs de structure avec la phase associée pour les films DPPC et DP-DGTS, mesurés à un contraste 8 % D₂O à 50°C. **RH** : l'humidité relative.

Annexes du chapitre 2 :

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd
25.0	298.2	53.7	0.274	7.9	0.278	39.5	0.000
25.0	298.2	73.2	0.363	7.6	0.367	40.1	0.539
25.0	298.2	84.9	0.421	7.4	0.423	41.4	0.837
25.0	298.2	90.1	0.441	7.2	0.444	42.8	0.598
25.0	298.2	92.8	0.453	7.0	0.456	43.5	0.658
25.0	298.2	98.6	0.482	6.3	0.484	44.5	0.904
25.1	298.2	100.0	0.490	4.1	0.492	48.8	0.593

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd	d_b (Å)	d_w (Å)	δd_w
24.9	298.1	75.3	0.376	7.6	0.379	39.0	0.244	26.5	12.5	0.244
25.0	298.1	87.2	0.429	7.3	0.432	40.4	0.038	25.6	14.8	0.038
25.1	298.3	94.6	0.461	6.9	0.464	41.8	0.225	25.1	16.6	0.225

Annexe 1 : Tableaux des données obtenues pour le film 0 ASQD mesuré en phase fluide à un contraste à 100 % D₂O (**en haut**) et à 8 % D₂O (**en bas**), à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période, **d_b** : l'épaisseur de la bicouche, **d_w** : l'épaisseur de la couche d'eau.

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd
24.8	297.9	27.4	0.148	8.3	0.156	37.5	0.000
24.8	298.0	53.5	0.270	7.9	0.274	38.7	0.000
24.9	298.0	73.3	0.363	7.6	0.367	41.1	0.071
24.9	298.1	85.2	0.416	7.3	0.419	42.6	0.352
24.9	298.1	90.5	0.441	7.1	0.444	44.1	0.413
24.9	298.1	93.2	0.453	7.0	0.456	44.8	0.424
24.9	298.1	96.0	0.465	6.8	0.468	45.7	0.810
24.9	298.1	98.8	0.482	6.2	0.484	50.5	0.911

Annexe 2 : Tableau des données obtenues pour le film 4 ASQD mesuré en phase fluide à un contraste à 100 % D₂O, à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période.

T (°C)	T (K)	RH (%)	δ RH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd
24.2	297.3	28.6	0.152	8.2	0.160	37.9	0.000
24.5	297.6	54.6	0.278	7.9	0.282	39.1	0.000
24.6	297.8	74.2	0.368	7.6	0.371	41.7	0.186
24.8	297.9	85.6	0.421	7.3	0.423	43.4	0.067
24.8	297.9	91.1	0.445	7.1	0.448	44.3	0.329
24.8	297.9	93.7	0.457	6.9	0.460	45.1	0.337
24.8	297.9	96.4	0.470	6.7	0.472	46.0	0.252
24.8	298.0	100.0	0.498	4.1	0.501	47.7	0.670

T (°C)	T (K)	RH (%)	δ RH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd	d_b (Å)	d_w (Å)	δd_w
25.2	298.3	74.1	0.368	7.6	0.371	41.4	0.161	27.7	13.7	0.161
25.2	298.4	86.1	0.425	7.3	0.428	42.4	0.310	26.6	15.8	0.310
25.2	298.4	94.3	0.461	6.9	0.464	45.4	0.412	29.0	16.4	0.412

Annexe 3 : Tableaux résumés des données obtenues pour le film 40 ASQD mesuré en phase fluide à un contraste à 100 % D₂O (**en haut**) et à 8 % D₂O (**en bas**), à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période, **d_b** : l'épaisseur de la bicouche, **d_w** : l'épaisseur de la couche d'eau.

0 ASQD			40 ASQD		
RH (%)	Bragg order h	Fluid phase	RH (%)	Bragg order h	Fluid phase
75.3	1	- 22.858	74.1	1	- 24.831
	2	- 2.825		2	- 3.417
87.2	1	- 26.389	86.1	1	- 24.930
	2	- 5.773		2	- 5.761
94.6	1	- 24.618	94.3	1	- 23.053
	2	- 8.886		2	- 8.862
				3	2.433

Annexe 4 : Tableaux des facteurs de structure avec la phase associée pour les films 0 ASQD et 40 ASQD, mesurés en phase fluide à un contraste 8 % D₂O, à 25°C. **RH** : l'humidité relative.

Annexes du chapitre 3 :

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd
24.8	298.0	27.3	0.148	8.3	0.156	42.8	0.273
24.9	298.0	53.5	0.270	7.9	0.274	45.1	0.111
24.9	298.0	73.3	0.368	7.6	0.371	45.6	0.389
24.9	298.1	85.2	0.421	7.3	0.423	46.3	0.541
24.9	298.1	90.5	0.445	7.1	0.448	46.7	0.745
24.9	298.1	93.1	0.457	7.0	0.460	47.8	0.163
24.9	298.1	96.0	0.465	6.8	0.468	48.0	0.524
24.9	298.1	98.8	0.482	6.2	0.484	49.9	0.559

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd	d_b (Å)	d_w (Å)	δd_w
25.2	298.3	30.3	0.160	8.2	0.167	47.2	0.139			
25.5	298.6	54.1	0.274	7.9	0.278	48.1	0.086	36.3	11.8	0.086
25.5	298.7	73.5	0.363	7.6	0.367	49.4	0.387	36.8	12.6	0.387
25.5	298.7	85.3	0.416	7.3	0.419	50.7	0.289	35.7	15.0	0.289
25.5	298.7	90.6	0.441	7.1	0.444	51.5	0.027	35.1	16.4	0.027
25.5	298.7	93.3	0.453	7.0	0.456	52.2	0.097	34.9	17.3	0.097
25.5	298.7	96.0	0.470	6.8	0.472	53.8	0.054	35.0	18.9	0.054

Annexe 1 : Tableaux des données obtenues pour le film PG mesuré en phase fluide à un contraste à 100 % D₂O (**en haut**) et à 8 % D₂O (**en bas**), à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période, **d_b** : l'épaisseur de la bicouche, **d_w** : l'épaisseur de la couche d'eau.

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd
24.2	297.4	28.5	0.152	8.2	0.160	48.1	0.010
24.5	297.6	54.5	0.274	7.9	0.278	48.8	0.119
24.7	297.8	73.9	0.368	7.6	0.371	48.6	0.190
24.7	297.9	85.6	0.425	7.3	0.428	48.8	0.011
24.7	297.9	90.8	0.445	7.1	0.448	49.2	0.056
24.8	297.9	93.4	0.457	7.0	0.460	49.8	0.108
24.8	298.0	96.2	0.470	6.7	0.472	50.7	0.185
24.8	298.0	98.8	0.482	6.2	0.484	54.5	0.288

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd	d_b (Å)	d_w (Å)	δd_w
25.1	298.3	30.2	0.160	8.2	0.167	45.1	0.064			
25.2	298.3	54.1	0.274	7.9	0.278	45.8	0.440			
25.2	298.4	74.0	0.363	7.6	0.367	47.0	0.199	37.4	9.6	0.199
25.2	298.4	86.0	0.425	7.3	0.428	49.3	0.022	36.8	12.4	0.022
25.2	298.4	91.4	0.445	7.1	0.448	49.7	0.059	36.5	13.2	0.059
25.2	298.4	94.1	0.461	6.9	0.464	50.9	0.146	35.6	15.3	0.146
25.2	298.4	97.0	0.470	6.6	0.472	52.2	0.311	35.5	16.7	0.311

Annexe 2 : Tableaux des données obtenues pour le film SQDG mesuré en phase fluide à un contraste à 100 % D₂O (**en haut**) et à 8 % D₂O (**en bas**), à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période, **d_b** : l'épaisseur de la bicouche, **d_w** : l'épaisseur de la couche d'eau.

PG			SQDG		
RH (%)	Bragg order h	Fluid phase	RH (%)	Bragg order h	Fluid phase
54.1	1	- 28.012	74.0	1	- 21.537
	2	- 3.278		2	
	3	5.187		3	5.177
	4	- 11.546	86.0	1	- 17.976
73.5	1	- 24.381		2	- 2.617
	2	- 2.368		3	4.192
	3	7.444		91.4	1
4	- 4.078	2	- 3.194		
85.3	1	- 20.175	3		3.399
	2	- 5.597	94.1	1	- 13.587
	3	6.493		2	- 3.844
90.6	1	- 18.046		3	5.029
	2	- 7.301	97.0	1	- 11.875
	3	6.781		2	- 4.874
93.3	1	- 16.980		3	4.578
	2	- 8.505			
	3	6.766			
96.0	1	- 14.371			
	2	- 9.778			
	3	5.728			

Annexe 3 : Tableaux des facteurs de structure avec la phase associée pour les films PG et SQDG, mesurés en phase fluide à un contraste 8 % D₂O, à 25°C. **RH** : l'humidité relative.

Annexes du chapitre 4 :

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd
23.8	296.9	41.6	0.217	8.1	0.222	39.1	0.000
24.1	297.2	56.8	0.290	7.9	0.294	39.5	0.000
24.2	297.4	72.5	0.363	7.6	0.367	40.1	0.000
24.5	297.6	86.1	0.425	7.3	0.428	40.9	0.296
24.5	297.7	91.4	0.449	7.1	0.452	41.3	0.223
24.6	297.8	96.4	0.469	6.7	0.472	42.0	0.227
24.8	297.9	100.0	0.494	4.1	1.000	43.4	0.785

Annexe 1 : Tableaux des données obtenues pour le film OEM mesuré en phase fluide à un contraste à 100 % D₂O, à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, **Π** : la pression osmotique, **d** : la période.

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd
24.6	297.8	28.2	0.152	8.2	0.160	44.5	0.464
24.6	297.8	39.6	0.209	8.1	0.214	45.3	0.386
24.6	297.8	55.0	0.278	7.9	0.282	45.9	0.394
24.6	297.8	70.9	0.355	7.7	0.359	46.7	0.404
24.6	297.8	85.3	0.421	7.3	0.423	48.9	0.020
24.6	297.8	90.6	0.445	7.1	0.448	49.5	0.023
24.6	297.8	96.3	0.470	6.7	0.472	51.0	0.087
24.6	297.8	99.9	0.498	5.1	1.000	51.4	0.002

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd	d_b (Å)	d_w (Å)	δd_w
24.9	298.2	75.0	0.372	7.6	0.375	45.6	0.552	35.4	10.2	0.552
25.0	298.2	87.2	0.425	7.3	0.428	46.8	0.972	34.1	12.8	0.972
25.1	298.2	94.9	0.461	6.8	0.464	48.3	0.227	33.2	15.0	0.228

Annexe 2 : Tableaux des données obtenues pour le film OEM-PC mesuré en phase fluide à un contraste à 100 % D₂O (**en haut**) et à 8 % D₂O (**en bas**), à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, **Π** : la pression osmotique, **d** : la période, **d_b** : l'épaisseur de la bicouche, **d_w** : l'épaisseur de la couche d'eau.

	T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log\Pi$ (Pa)	$\delta\Pi$	d (Å)	δd
Phase 1	24.8	297.9	27.9	0.152	8.2	0.160	38.5	0.000
	24.7	297.8	39.5	0.205	8.1	0.211	39.1	0.347
	24.6	297.8	55.1	0.278	7.9	0.282	40.7	0.034
	24.7	297.8	70.7	0.355	7.7	0.359	42.2	0.308
	24.7	297.8	85.0	0.416	7.4	0.419	43.9	0.369
	24.7	297.9	90.0	0.445	7.2	0.448	45.4	0.071
Phase 2	24.7	297.8	70.7	0.355	7.7	0.359	39.9	0.428
	24.7	297.8	85.0	0.416	7.4	0.419	41.1	0.336
	24.7	297.9	90.0	0.445	7.2	0.448	42.5	0.852
	24.7	297.8	96.0	0.469	6.7	0.472	47.7	0.037
	24.7	297.8	100.0	0.498	4.1	1.000	49.2	0.157

Annexe 3 : Tableaux des données obtenues pour le film OEM-PC+DGDG mesuré en phase fluide à un contraste à 100 % D₂O, à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, **Π** : la pression osmotique, **d** : la période.

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd
23.5	296.6	30.1	0.160	8.2	0.167	41.9	0.227
23.5	296.6	42.4	0.221	8.1	0.226	42.8	0.355
23.8	296.9	57.9	0.294	7.9	0.298	44.5	0.509
24.1	297.3	73.1	0.368	7.6	0.371	47.1	0.112
24.4	297.6	86.4	0.429	7.3	0.432	47.3	0.362
24.6	297.7	91.0	0.449	7.1	0.452	48.0	0.370
24.6	297.8	96.5	0.474	6.7	0.476	50.0	0.171
24.7	297.9	100.0	0.494	4.1	1.000	51.0	0.001

T (°C)	T (K)	RH (%)	δRH	$\log \Pi$ (Pa)	$\delta \Pi$	d (Å)	δd	d_b (Å)	d_w (Å)	δd_w
25.2	298.2	74.1	0.367	7.6	0.371	45.3	0.268	35.6	9.7	0.268
25.2	298.2	86.2	0.421	7.3	0.423	46.9	0.013	34.2	12.7	0.013
25.2	298.2	94.2	0.461	6.9	0.464	48.8	0.181	33.4	15.4	0.128

Annexe 4 : Tableaux des données obtenues pour le film OEM-DGDG+PC mesuré en phase fluide à un contraste à 100 % D₂O (**en haut**) et à 8 % D₂O (**en bas**), à 25°C. **T** : la température de l'échantillon, **RH** : l'humidité relative, Π : la pression osmotique, **d** : la période, **d_b** : l'épaisseur de la bicouche, **d_w** : l'épaisseur de la couche d'eau.

OEM-PC			OEM-DGDG+PC		
RH	Bragg order h	Fluid phase	RH	Bragg order h	Fluid phase
75.0	1	- 28.275	74.1	1	- 22.319
	2	- 8.130		2	- 5.836
87.2	1	- 25.688	86.2	1	- 17.623
	2	- 5.281		2	- 3.991
	3	6.986		3	3.770
94.9	1	- 21.484	94.2	1	- 13.442
	2	- 7.922		2	- 5.306
	3	7.156		3	4.484

Annexe 5 : Tableaux des facteurs de structure avec la phase associée pour les films OEM-PC et OEM-DGDG+PC, mesurés en phase fluide à un contraste 8 % D₂O, à 25°C. **RH** : l'humidité relative.

Références bibliographiques

A

- Abida, H., Dolch, L.-J., Meï, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M.A., Finazzi, G., Bastien, O., Tirichine, L., Bowler, C., Rébeillé, F., Petroutsos, D., Jouhet, J., Maréchal, E., 2015. Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology* 167, 118–136. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252395>
- Alipanah, L., Winge, P., Rohloff, J., Najafi, J., Brembu, T., Bones, A.M., 2018. Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE* 13, e0193335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193335>
- Altschul, S., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schaffer, A.A., Yu, Y.-K., 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal* 272, 5101–5109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x>
- Andersen, R.A., Brett, R.W., Potter, D., Sexton, J.P., 1998. Phylogeny of the Eustigmatophyceae Based upon 18S rDNA, with Emphasis on Nannochloropsis. *Protist* 149, 61–74. [https://doi.org/10.1016/S1434-4610\(98\)70010-0](https://doi.org/10.1016/S1434-4610(98)70010-0)
- Andersson, M.X., Stridh, M.H., Larsson, K.E., Liljenberg, C., Sandelius, A.S., 2003. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Letters* 537, 128–132. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00109-1)
- Archibald, J.M., Keeling, P.J., 2002. Recycled plastids: a ‘green movement’ in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics* 18, 577–584. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02777-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02777-4)

B

- Babiychuk, E., Müller, F., Eubel, H., Braun, H.-P., Frentzen, M., Kushnir, S., 2003. *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function: *Arabidopsis phosphatidylglycerophosphate synthase 1*. *The Plant Journal* 33, 899–909. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01680.x>
- Bellou, S., Baeshen, M.N., Elazzazy, A.M., Aggeli, D., Sayegh, F., Aggelis, G., 2014. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 32, 1476–1493. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>
- Benning, C., Beatty, J.T., Prince, R.C., Somerville, C.R., 1993. The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 1561–1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1561>
- Berges, J.A., Franklin, D.J., Harrison, P.J., 2001. Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *Journal of Phycology* 37, 1138–1145. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01052.x>
- Better Crops With Plant Food: Phosphorus for Agriculture, Donald L. Armstrong, ed, 1999.
- Bishop, D.G., Kenrick, J.R., 1987. Thermal properties of 1-hexadecanoyl-2-trans-3-hexadecanoyl phosphatidylglycerol. *Phytochemistry* 26, 3065–3067. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84594-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84594-X)
- Bjerrum, J., Schwarzenbach, G., Sillén, L.G., 1958. Stability Constants, The Chemical Society, London. ed.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Block, M.A., Dorne, A.-J., Joyard, J., Douce, R., 1984. Preparation and Characterization of Membrane Fractions Enriched in Outer and Inner Envelope Membranes from Spinach Chloroplasts, in: Sybesma, C. (Ed.), *Advances in Photosynthesis Research*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 27–30. https://doi.org/10.1007/978-94-017-4973-2_5
- Block, M.A., Douce, R., Joyard, J., Rolland, N., 2007. Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynth Res* 92, 225–244. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9195-8>
- Block, M.A., Jouhet, J., 2015. Lipid trafficking at endoplasmic reticulum–chloroplast membrane contact sites. *Current Opinion in Cell Biology* 35, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.03.004>
- Bohlin, von K., 1897. Zur Morphologie und Biologie einzelliger Algen. *Öfversigt af Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar*, Stockholm 54, 507–529.
- Bottier, C., Géan, J., Artzner, F., Desbat, B., Pézolet, M., Renault, A., Marion, D., Vié, V., 2007. Galactosyl headgroup interactions control the molecular packing of wheat lipids in Langmuir films and in hydrated liquid-crystalline mesophases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768, 1526–1540. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.02.021>
- Boudière, L., Botté, C.Y., Saidani, N., Lajoie, M., Marion, J., Bréhélin, L., Yamaryo-Botté, Y., Satiat-Jeunemaître, B., Breton, C., Girard-Egrot, A., Bastien, O., Jouhet, J., Falconet, D., Block, M.A., Maréchal, E., 2012. Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. *Mol. BioSyst.* 8, 2023. <https://doi.org/10.1039/c2mb25067e>

- Boudière, L., Michaud, M., Petroustos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J., Block, M.A., Maréchal, E., 2014. Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 470–480. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.09.007>
- Bradshaw, J.P., Bushby, R.J., Giles, C.C.D., Saunders, M.R., Reid, D.G., 1996. Neutron diffraction reveals the orientation of the headgroup of inositol lipids in model membranes. *Nat Struct Mol Biol* 3, 125–127. <https://doi.org/10.1038/nsb0296-125>
- Browse, J., Kunst, L., Anderson, S., Hugly, S., Somerville, C., 1989. A Mutant of *Arabidopsis* Deficient in the Chloroplast 16:1/18:1 Desaturase. *Plant Physiol.* 90, 522–529. <https://doi.org/10.1104/pp.90.2.522>
- Burgos, A., Szymanski, J., Seiwert, B., Degenkolbe, T., Hannah, M.A., Gialvalisco, P., Willmitzer, L., 2011. Analysis of short-term changes in the *Arabidopsis thaliana* glycerolipidome in response to temperature and light: *Arabidopsis* glycerolipids in abiotic stress. *The Plant Journal* 66, 656–668. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04531.x>

C

- Calder, P.C., 2015. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 39, 18S–32S. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Calvez, P., Jouhet, J., Vié, V., Durmort, C., Zapun, A., 2019. Lipid Phases and Cell Geometry During the Cell Cycle of *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 10, 351. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00351>
- Cañavate, J.P., Armada, I., Ríos, J.L., Hachero-Cruzado, I., 2016. Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* 124, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.02.007>
- Caplan, J.L., Kumar, A.S., Park, E., Padmanabhan, M.S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K., Dinesh-Kumar, S.P., 2015. Chloroplast Stromules Function during Innate Immunity. *Developmental Cell* 34, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.011>
- Carstensen, A., Herdean, A., Schmidt, S.B., Sharma, A., Spetea, C., Pribil, M., Husted, S., 2018. The Impacts of Phosphorus Deficiency on the Photosynthetic Electron Transport Chain. *Plant Physiol.* 177, 271–284. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01624>
- Chen, Yanbo, Wu, P., Zhao, Q., Tang, Y., Chen, Yaping, Li, M., Jiang, H., Wu, G., 2018. Overexpression of a Phosphate Starvation Response AP2/ERF Gene From Physic Nut in *Arabidopsis* Alters Root Morphological Traits and Phosphate Starvation-Induced Anthocyanin Accumulation. *Front. Plant Sci.* 9, 1186. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01186>
- Chevalier, F., Maréchal, É., 2015. Identification par deux criblages simultanés indépendants d'une famille d'inhibiteurs du métabolisme des glycérolipides. *Med Sci (Paris)* 31, 320–327. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153103018>
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 13.
- Colin, L.A., Jaillais, Y., 2020. Phospholipids across scales: lipid patterns and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 53, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.08.007>
- Connaissance des énergies, 2013. Biocarburant [WWW Document]. URL <https://www.connaissancedesenergies.org/fiche-pedagogique/biocarburant>
- Cook, R., Lupette, J., Benning, C., 2021. The Role of Chloroplast Membrane Lipid Metabolism in Plant Environmental Responses. *Cells* 10, 706. <https://doi.org/10.3390/cells10030706>
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16, 10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Costigan, S.C., Booth, P.J., Templer, R.H., 2000. Estimations of lipid bilayer geometry in fluid lamellar phases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1468, 41–54. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00220-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00220-0)
- Crisuolo, A., Gribaldo, S., 2010. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* 10, 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>
- Cristiglio, V., Giroud, B., Didier, L., Demé, B., 2015. D16 is back to business: more neutrons, more space, more fun. *Neutron News* 26, 22–24. <https://doi.org/10.1080/10448632.2015.1057051>

D

- Daum, B., Kuhlbrandt, W., 2011. Electron tomography of plant thylakoid membranes. *Journal of Experimental Botany* 62, 2393–2402. <https://doi.org/10.1093/jxb/err034>
- Davis, J.H., 1983. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by 2H-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta* 737, 55. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(83\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0304-4157(83)90015-1)
- de Mendoza, D., Pilon, M., 2019. Control of membrane lipid homeostasis by lipid-bilayer associated sensors: A mechanism conserved from bacteria to humans. *Progress in Lipid Research* 76, 100996. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.100996>
- Delacroix, H., Gulik-Krzywicki, T., Mariani, P., Luzzati, V., 1993. Freeze-fracture Electron Microscope Study of Lipid Systems. *Journal of Molecular Biology* 229, 526–539. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1052>
- Demé, B., Cataye, C., Block, M.A., Maréchal, E., Jouhet, J., 2014. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *The FASEB Journal* 11.
- Demetzos, C., 2008. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research* 18, 159–173. <https://doi.org/10.1080/08982100802310261>

- Demurtas, D., Guichard, P., Martiel, I., Mezzenga, R., Hébert, C., Sagalowicz, L., 2015. Direct visualization of dispersed lipid bicontinuous cubic phases by cryo-electron tomography. *Nat Commun* 6, 8915. <https://doi.org/10.1038/ncomms9915>
- Donaldson, L., 2020. Autofluorescence in Plants. *Molecules* 25, 2393. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>
- Dorne, A.J., Joyard, J., Block, M.A., Douce, R., 1985. Localization of phosphatidylcholine in outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *Journal of Cell Biology* 100, 1690–1697. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.5.1690>
- Dorne, A.J., Joyard, J., Douce, R., 1990. Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 71–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.71>
- Douce, R., Holtz, R.B., Benson, A.A., 1973. Isolation and Properties of the Envelope of Spinach Chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 248, 7215–7222. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43381-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43381-4)
- Douce, R., Joyard, J., 1990. Biochemistry and Function of the Plastid Envelope. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6, 173–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.06.110190.001133>
- Dubacq, J., Tremolieres, A., 1983. Occurrence and Function of Phosphatidylglycerol Containing Delta-3-Trans-Hexadecenoic Acid in Photosynthetic Lamellae. *Physiol Veg* 21, 293–312.
- Dubots, E., Botté, C., Boudière, L., Yamaryo-Botté, Y., Jouhet, J., Maréchal, E., Block, M.A., 2012. Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie* 94, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.03.012>
- Dufourc, E.J., Mayer, C., Stohrer, J., Althoff, G., Kothe, G., 1992. Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. Comprehensive analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements. *Biophysical Journal* 61, 16. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81814-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81814-3)

E

- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Eeman, M., Deleu, M., 2010. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18.
- Eichenberger, W., 1993. Betaine lipids in lower plant. Distribution of DGTS, DGTA and phospholipids, and the intracellular localization and site of biosynthesis of DGTS. *Plant physiology and biochemistry* 31, 213–221.
- Eichenberger, W., Gribi, C., 1997. Lipids of *Pavlova lutheri*: Cellular site and metabolic role of DGCC. *Phytochemistry* 45, 1561–1567. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00201-X)
- Elser, J.J., Bracken, M.E.S., Cleland, E.E., Gruner, D.S., Harpole, W.S., Hillebrand, H., Ngai, J.T., Seabloom, E.W., Shurin, J.B., Smith, J.E., 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol Letters* 10, 1135–1142. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x>
- Endo, K., Kobayashi, K., Wada, H., 2016. Sulfoquinovosyldiacylglycerol has an Essential Role in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 Under Phosphate-Deficient Conditions. *Plant Cell Physiol* 57, 2461–2471. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw159>
- Esquembre, R., Ferrer, M.L., Gutiérrez, M.C., Mallavia, R., Mateo, C.R., 2007. Fluorescence Study of the Fluidity and Cooperativity of the Phase Transitions of Zwitterionic and Anionic Liposomes Confined in Sol–Gel Glasses. *J. Phys. Chem. B* 111, 3665–3673. <https://doi.org/10.1021/jp068685y>
- Essigmann, B., Guler, S., Narang, R.A., Linke, D., Benning, C., 1998. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 1950–1955. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1950>

F

- Falciatore, A., 2000. Perception of Environmental Signals by a Marine Diatom. *Science* 288, 2363–2366. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2363>
- Falkowski, P.G., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281, 200–206. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>
- Fawley, M.W., Jameson, I., Fawley, K.P., 2015. The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia* 54, 545–552. <https://doi.org/10.2216/15-60.1>
- Fernandes, M.X., Castanho, M.A.R.B., García de la Torre, J., 2002. Brownian dynamics simulation of the unsaturated lipidic molecules oleic and docosahexaenoic acid confined in a cellular membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1565, 29–35. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00501-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00501-1)
- Fernández-Morán, H., Finean, J.B., 1957. Electron microscope and low-angle X-ray diffraction studies of the nerve myelin sheath. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 3, 725–748. <https://doi.org/10.1083/jcb.3.5.725>
- Finean, J.B., Hutchinson, A.L., 1988. X-Ray diffraction studies of lipid phase transitions in cholesterol-rich membranes at sub-zero temperatures. *Chemistry and Physics of Lipids* 46, 63–71. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(88\)90115-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(88)90115-6)
- Flori, S., Jouneau, P.-H., Bailleul, B., Gallet, B., Estrozi, L.F., Moriscot, C., Bastien, O., Eicke, S., Schober, A., Bártulos, C.R., Maréchal, E., Kroth, P.G., Petroustos, D., Zeeman, S., Breyton, C., Schoehn, G., Falconet, D., Finazzi, G., 2017. Plastid thylakoid architecture optimizes photosynthesis in diatoms. *Nat Commun* 8, 15885. <https://doi.org/10.1038/ncomms15885>
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)

- Fragneto, G., Charitat, T., Bellet-Amalric, E., Cubitt, R., Graner, F., 2003. Swelling of Phospholipid Floating Bilayers: The Effect of Chain Length. *Langmuir* 19, 7695–7702. <https://doi.org/10.1021/la026972x>
- Frentzen, M., Griebau, R., 1994. Biosynthesis of Cardiolipin in Plant Mitochondria. *Plant Physiol.* 106, 1527–1532. <https://doi.org/10.1104/pp.106.4.1527>
- Frentzen, M., Heinz, E., McKEON, T.A., Stumpf, P.K., 1983. Specificities and Selectivities of Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase and Monoacylglycerol-3-Phosphate Acyltransferase from Pea and Spinach Chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* 129, 629–636. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07096.x>
- Furlan, A.L., Laurin, Y., Botcazon, C., Rodríguez-Moraga, N., Rippa, S., Deleu, M., Lins, L., Sarazin, C., Buchoux, S., 2020. Contributions and Limitations of Biophysical Approaches to Study of the Interactions between Amphiphilic Molecules and the Plant Plasma Membrane. *Plants* 9, 648. <https://doi.org/10.3390/plants9050648>

G

- Giroud, C., Gerber, A., Eichenberger, W., 1988. Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of Molecular Species and Intracellular Site(s) of Biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077533>
- Goksu, E.I., Vanegas, J.M., Blanchette, C.D., Lin, W.-C., Longo, M.L., 2009. AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788, 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.021>
- Gonthier, J., Barrett, M.A., Aguetaz, O., Baudoin, S., Bourgeat-Lami, E., Demé, B., Grimm, N., Hauß, T., Kiefer, K., Lelièvre-Berna, E., Perkins, A., Wallacher, D., 2019. BerILL: The ultimate humidity chamber for neutron scattering. *JNR* 21, 65–76. <https://doi.org/10.3233/JNR-190109>
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, in: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US, Boston, MA, pp. 29–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms: i. *Cyclotella nana* hustedt, and *Detonula confervacea* (cleve) gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Güler, S., Seeliger, A., Härtel, H., Renger, G., Benning, C., 1996. A Null Mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 Deficient in the Sulfolipid Sulfoquinovosyl Diacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* 271, 7501–7507. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7501>
- Gulik-Krzywicki, T., 1997. Freeze-fracture transmission electron microscopy. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2, 8. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(97\)80017-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(97)80017-9)
- Guschina, I.A., Harwood, J.L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45, 160–186. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>

H

- Hagio, M., Sakurai, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Wada, H., 2002. Phosphatidylglycerol is Essential for the Development of Thylakoid Membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 43, 1456–1464. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf185>
- Hamilton, M.L., Haslam, R.P., Napier, J.A., Sayanova, O., 2014. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricorutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering* 22, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.12.003>
- Hamilton, M.L., Warwick, J., Terry, A., Allen, M.J., Napier, J.A., Sayanova, O., 2015. Towards the Industrial Production of Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids from a Genetically Modified Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *PLoS ONE* 10, e0144054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144054>
- Harroun, T.A., Katsaras, J., Wassall, S.R., 2008. Cholesterol Is Found To Reside in the Center of a Polyunsaturated Lipid Membrane. *Biochemistry* 47, 7090–7096. <https://doi.org/10.1021/bi800123b>
- Härtel, H., Peters-Kottig, M., Benning, C., 1998. The phospholipid-deficient *pho1* mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 14.
- Harwood, J.L., 2004. Membrane Lipids in Algae, in: Paul-André, S., Norio, M. (Eds.), *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics, Advances in Photosynthesis and Respiration*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 53–64. https://doi.org/10.1007/0-306-48087-5_3
- Hecky, R.E., Kilham, P., 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment 1 27.
- Heemskerck, J.W.M., Schmidt, H., Hammer, U., Heinz, E., 1991. Biosynthesis and Desaturation of Prokaryotic Galactolipids in Leaves and Isolated Chloroplasts from Spinach. *Plant Physiol.* 96, 144–152. <https://doi.org/10.1104/pp.96.1.144>
- Heinz, E., Roughan, P.G., 1983. Similarities and Differences in Lipid Metabolism of Chloroplasts Isolated from 18:3 and 16:3 Plants. *Plant Physiology* 72, 7. <https://doi.org/10.1104/pp.72.2.273>
- Hildebrand, M., Davis, A.K., Smith, S.R., Traller, J.C., Abbriano, R., 2012. The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels* 3, 221–240. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.157>
- Hirashima, T., Toyoshima, M., Moriyama, T., Sato, N., 2018. Evolution of the Phosphatidylcholine Biosynthesis Pathways in Green Algae: Combinatorial Diversity of Methyltransferases. *J Mol Evol* 86, 68–76. <https://doi.org/10.1007/s00239-017-9826-4>

- Hözl, G., Witt, S., Gaude, N., Melzer, M., Schöttler, M.A., Dörmann, P., 2009. The Role of Diglycosyl Lipids in Photosynthesis and Membrane Lipid Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 150, 1147–1159. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139758>
- Howard, K.P., Prestegard, J.H., 1996. Conformation of sulfoquinovosyldiacylglycerol bound to a magnetically oriented membrane system. *Biophysical Journal* 71, 2573–2582. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79449-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79449-3)
- Hyvönen, M.T., Rantala, T.T., Ala-Korpela, M., 1997. Structure and dynamic properties of diunsaturated 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine lipid bilayer from molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal* 73, 2907–2923. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78319-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78319-X)

I

- Ibarguren, M., López, D.J., Escribá, P.V., 2014. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 1518–1528. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.12.021>

J

- Janiak, M.J., Small, D.M., Shipley, G.G., 1979. Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. *J Biol Chem* 254, 6068–6078.
- Jinkerson, R.E., n.d. Table d'optimisation [WWW Document]. URL https://sites.google.com/site/robertjinkerson/nannochloropsis/codon_table
- Johnson, M.P., Goral, T.K., Duffy, C.D.P., Brain, A.P.R., Mullineaux, C.W., Ruban, A.V., 2011. Photoprotective Energy Dissipation Involves the Reorganization of Photosystem II Light-Harvesting Complexes in the Grana Membranes of Spinach Chloroplasts. *The Plant Cell* 23, 1468–1479. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081646>
- Johnson, M.P., Vasilev, C., Olsen, J.D., Hunter, C.N., 2014. Nanodomains of Cytochrome *b 6 f* and Photosystem II Complexes in Spinach Grana Thylakoid Membranes. *The Plant Cell* 26, 3051–3061. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127233>
- Jónasdóttir, S., 2019. Fatty Acid Profiles and Production in Marine Phytoplankton. *Marine Drugs* 17, 151. <https://doi.org/10.3390/md17030151>
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* 8, 275–282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Jordan, B.R., Chow, W.-S., Baker, A.J., 1983. The role of phospholipids in the molecular organisation of pea chloroplast membranes. Effect of phospholipid depletion on photosynthetic activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 725, 77–86. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(83\)90226-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(83)90226-8)
- Jouhet, J., 2013. Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00494>
- Jouhet, J., Lupette, J., Clerc, O., Magneschi, L., Bedhomme, M., Collin, S., Roy, S., Maréchal, E., Rébeillé, F., 2017. LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: Consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. *PLoS ONE* 12, e0182423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182423>
- Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J., Block, M.A., 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* 167, 863–874. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407022>
- Jouhet, J., Maréchal, E., Bligny, R., Joyard, J., Block, M.A., 2003. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Letters* 544, 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00477-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00477-0)
- Joyard, J., Maréchal, E., Block, M.A., Douce, R., 1996. Plant galactolipids and sulfolipid. Structure, distribution and biosynthesis., in: *Membranes: Specialized Function in Plants*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, pp. 179–194.

K

- Kalisch, B., Dörmann, P., Hözl, G., 2016. DGDG and Glycolipids in Plants and Algae, in: Nakamura, Y., Li-Beisson, Y. (Eds.), *Lipids in Plant and Algae Development*. Springer International Publishing, Cham, pp. 51–83. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_3
- Kanduč, M., Schlaich, A., de Vries, A.H., Jouhet, J., Maréchal, E., Demé, B., Netz, R.R., Schneck, E., 2017. Tight cohesion between glycolipid membranes results from balanced water–headgroup interactions. *Nat Commun* 8, 14899. <https://doi.org/10.1038/ncomms14899>
- Kang, H., Jia, C., Liu, N., Aboagla, A.A.A., Chen, W., Gong, W., Tang, S., Hong, Y., 2020. Plastid Glycerol-3-phosphate Acyltransferase Enhanced Plant Growth and Prokaryotic Glycerolipid Synthesis in Brassica napus. *IJMS* 21, 5325. <https://doi.org/10.3390/ijms21155325>
- Kariel, N., Davidson, E., Keough, K.M.W., 1991. Cholesterol does not remove the gel-liquid crystalline phase transition of phosphatidylcholines containing two polyenoic acyl chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1062, 70–76. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90336-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90336-7)
- Katayama, K., Sakurai, I., Wada, H., 2004. Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene for cardiolipin synthase located in mitochondria. *FEBS Letters* 577, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.009>
- Kato, M., Sakai, M., Adachi, K., Ikemoto, H., Sano, H., 1996. Distribution of betaine lipids in marine algae. *Phytochemistry* 42, 1341–1345. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00115-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00115-X)
- Kawski, A., 1993. Fluorescence Anisotropy: Theory and Applications of Rotational Depolarization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 23, 459–529. <https://doi.org/10.1080/10408349308051654>

- Kefauver, J.M., Ward, A.B., Patapoutian, A., 2020. Discoveries in structure and physiology of mechanically activated ion channels. *Nature* 587, 567–576. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2933-1>
- Kelly, A.A., Froehlich, J.E., Dörmann, P., 2003. Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* Reveals the Existence of an Additional Enzyme of Galactolipid Synthesis. *Plant Cell* 15, 2694–2706. <https://doi.org/10.1105/tpc.016675>
- Kim, H.U., Huang, A.H.C., 2004. Plastid Lysophosphatidyl Acyltransferase Is Essential for Embryo Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134, 1206–1216. <https://doi.org/10.1104/pp.103.035832>
- Kim, Y., Terng, E.L., Riekhof, W.R., Cahoon, E.B., Cerutti, H., 2018. Endoplasmic reticulum acyltransferase with prokaryotic substrate preference contributes to triacylglycerol assembly in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 1652–1657. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715922115>
- Kirchhoff, H., Lenhert, S., Büchel, C., Chi, L., Nield, J., 2008. Probing the Organization of Photosystem II in Photosynthetic Membranes by Atomic Force Microscopy †. *Biochemistry* 47, 431–440. <https://doi.org/10.1021/bi7017877>
- Kobayashi, K., 2016. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* 129, 565–580. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0827-y>
- Kobayashi, K., Endo, K., Wada, H., 2016. Roles of Lipids in Photosynthesis, in: Nakamura, Y., Li-Beisson, Y. (Eds.), *Lipids in Plant and Algae Development, Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 21–49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_2
- Kobayashi, K., Fujii, S., Sato, M., Toyooka, K., Wada, H., 2015. Specific role of phosphatidylglycerol and functional overlaps with other thylakoid lipids in *Arabidopsis* chloroplast biogenesis. *Plant Cell Rep* 34, 631–642. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1719-z>
- Körbes, A.P., Kulcheski, F.R., Margis, R., Margis-Pinheiro, M., Turchetto-Zolet, A.C., 2016. Molecular evolution of the lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) gene family. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 96, 55–69. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.12.001>
- Kowalik, B., Schlaich, A., Kanduč, M., Schneck, E., Netz, R.R., 2017. Hydration Repulsion Difference between Ordered and Disordered Membranes Due to Cancellation of Membrane–Membrane and Water-Mediated Interactions. *J. Phys. Chem. Lett.* 8, 2869–2874. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.7b00977>
- Koynova, R., Tenchov, B., 2008. Lipids: Phase Transitions, in: *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. webc287. <https://doi.org/10.1002/9780470048672.webc287>
- Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G.H., Barber, J., 2000. Phosphatidylglycerol Is Involved in the Dimerization of Photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* 275, 6509–6514. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6509>
- Kučerka, N., Nieh, M., Pencser, J., Sachs, J., Katsaras, J., 2009. What determines the thickness of a biological membrane. *gpb* 28, 117–125. https://doi.org/10.4149/gpb_2009_02_117
- Kučerka, N., Nieh, M.-P., Katsaras, J., 2011. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 2761–2771. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.022>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Künzler, K., Eichenberger, W., 1997. Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi. *Phytochemistry* 46, 883–892. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)81274-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)81274-5)
- Künzler, K., Eichenberger, W., Radunz, A., 1997. Intracellular localization of two betaine lipids by cell fractionation and immunomicroscopy. *Z Naturforsch C J Biosci* 52, 487–495.

L

- Latowski, D., Åkerlund, H.-E., Strzałka, K., 2004. Violaxanthin De-Epoxidase, the Xanthophyll Cycle Enzyme, Requires Lipid Inverted Hexagonal Structures for Its Activity. *Biochemistry* 43, 4417–4420. <https://doi.org/10.1021/bi049652g>
- Latza, V.M., Demé, B., Schneck, E., 2020. Membrane Adhesion via Glycolipids Occurs for Abundant Saccharide Chemistries. *Biophysical Journal* 118, 1602–1611. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.02.003>
- Le, S.Q., Gascuel, O., 2008. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Lei, N., Safinya, C.R., Bruinsma, R.F., 1995. Discrete Harmonic Model for Stacked Membranes: Theory and Experiment. *J. Phys. II France* 5, 1155–1163. <https://doi.org/10.1051/jp2:1995174>
- Lepault, J., Pattus, F., Martin, N., 1985. Cryo-electron microscopy of artificial biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 820, 315–318. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90126-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90126-9)
- Lewis, R.N.A.H., Mannock, D.A., McElhaney, R.N., 2007. Differential Scanning Calorimetry in the Study of Lipid Phase Transitions in Model and Biological Membranes, in: Dopico, A.M. (Ed.), *Methods in Membrane Lipids*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 171–195. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-519-0_12
- Liang, Iqbal, Wen, Tong, Liu, 2019. Phosphorus-Induced Lipid Class Alteration Revealed by Lipidomic and Transcriptomic Profiling in Oleaginous Microalga *Nannochloropsis* sp. *PJ12. Marine Drugs* 17, 519. <https://doi.org/10.3390/md17090519>
- Li-Beisson, Y., Thelen, J.J., Fedosejevs, E., Harwood, J.L., 2019. The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 74, 31–68. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.003>

- Lindberg, L., Santos, A.X.S., Riezman, H., Olsson, L., Bettiga, M., 2013. Lipidomic Profiling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* Reveals Critical Changes in Lipid Composition in Response to Acetic Acid Stress. *PLoS ONE* 8, e73936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073936>
- Lipids In Plants And Algae: from fundamental science to industrial applications., 2022. . ELSEVIER ACADEMIC PRESS, S.I.
- Lis, L.J., McAlister, M., Fuller, N., Rand, R.P., Parsegian, V.A., 1982. Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. *Biophys J* 37, 657–665.
- Lombard, J., 2014. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biol Direct* 9, 32. <https://doi.org/10.1186/s13062-014-0032-7>
- Loosley-Millman, M.E., Rand, R.P., Parsegian, V.A., 1982. Effects of monovalent ion binding and screening on measured electrostatic forces between charged phospholipid bilayers. *Biophysical Journal* 40, 221–232. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(82\)84477-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(82)84477-9)
- López, C.A., Sovova, Z., van Eerden, F.J., de Vries, A.H., Marrink, S.J., 2013. Martini Force Field Parameters for Glycolipids. *J. Chem. Theory Comput.* 9, 1694–1708. <https://doi.org/10.1021/ct3009655>
- Luchini, A., Corucci, G., Chaithanya Batchu, K., Laux, V., Haertlein, M., Cristiglio, V., Fragneto, G., 2021. Structural Characterization of Natural Yeast Phosphatidylcholine and Bacterial Phosphatidylglycerol Lipid Multilayers by Neutron Diffraction. *Front. Chem.* 9, 628186. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.628186>
- Luzzati, V., Husson, F., 1962. The structure of the liquid-crystalline phases of lipid-water systems. *Journal of Cell Biology* 12, 207–219. <https://doi.org/10.1083/jcb.12.2.207>

M

- Maat, D.S., Bale, N.J., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., Brussaard, C.P.D., 2016. Increasing P limitation and viral infection impact lipid remodeling of the picophytoplankton *Micromonas pusilla*. *Biogeosciences* 13, 1667–1676. <https://doi.org/10.5194/bg-13-1667-2016>
- Mahamid, J., Tegunov, D., Maiser, A., Arnold, J., Leonhardt, H., Pnitzko, J.M., Baumeister, W., 2019. Liquid-crystalline phase transitions in lipid droplets are related to cellular states and specific organelle association. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 16866–16871. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903642116>
- Manni, M.M., Tiberti, M.L., Pagnotta, S., Barelli, H., Gautier, R., Antonny, B., 2018. Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage. *eLife* 7, e34394. <https://doi.org/10.7554/eLife.34394>
- Marčelja, S., Radić, N., 1976. Repulsion of interfaces due to boundary water. *Chemical Physics Letters* 42, 129–130. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(76\)80567-2](https://doi.org/10.1016/0009-2614(76)80567-2)
- Maréchal, E. (Ed.), 2018. *Plastids: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer US, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8654-5>
- Martonosi, A., Kracke, G., Taylor, K.A., Dux, L., Peracchia, C., 1985. The regulation of the Ca²⁺ transport activity of sarcoplasmic reticulum. *Soc Gen Physiol Ser* 39, 57–85.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105, 1141–1157. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq028>
- Maulucci, G., Cohen, O., Daniel, B., Sansone, A., Petropoulou, P.I., Filou, S., Spyridonidis, A., Pani, G., De Spirito, M., Chatgillaloglu, C., Ferreri, C., Kypreos, K.E., Sasson, S., 2016. Fatty acid-related modulations of membrane fluidity in cells: detection and implications. *Free Radical Research* 50, S40–S50. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1231403>
- McDaniel, R.V., 1988. Neutron diffraction studies of digalactosyldiacylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 940, 158–164. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(88\)90020-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(88)90020-X)
- McElhaney, R.N., 1986. Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 864, 361–421. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(86\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0304-4157(86)90004-3)
- McIntosh, T.J., Magid, A.D., Simon, S.A., 1990. Interactions between charged, uncharged, and zwitterionic bilayers containing phosphatidylglycerol. *Biophysical Journal* 57, 1187–1197. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82638-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82638-2)
- Mendiola-Morgenthaler, L., Eichenberger, W., Boschetti, A., 1985. Isolation of chloroplast envelopes from *Chlamydomonas*. Lipid and polypeptide composition. *Plant Science* 41, 97–104. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90109-8)
- Metting, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17, 477–489. <https://doi.org/10.1007/BF01574779>
- Meyer, H.W., Richter, W., 2001. Freeze-fracture studies on lipids and membranes 30.
- Mills, M.M., Ridame, C., Davey, M., Roche, J.L., Geider, R.J., 2004. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic 429, 4.
- Ministère de la transition écologique, 2021. *Biocarburants [WWW Document]*. URL <https://www.ecologie.gouv.fr/biocarburants#:~:text=Les%20biocarburants%20sont%20des%20carburants,les%20carburants%20d'origine%20fossile>
- Mio, K., Sato, C., 2018. Lipid environment of membrane proteins in cryo-EM based structural analysis. *Biophys Rev* 10, 307–316. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0371-6>

- Mischel, M., Seelig, J., Braganza, L.F., Büldt, G., 1987. A neutron diffraction study of the headgroup conformation of phosphatidylglycerol from *Escherichia coli* membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 43, 237–246. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90020-X](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90020-X)
- Moore, C.M., Mills, M.M., Arrigo, K.R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P.W., Galbraith, E.D., Geider, R.J., Guieu, C., Jaccard, S.L., Jickells, T.D., La Roche, J., Lenton, T.M., Mahowald, N.M., Marañón, E., Marinov, I., Moore, J.K., Nakatsuka, T., Oschlies, A., Saito, M.A., Thingstad, T.F., Tsuda, A., Ulloa, O., 2013. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geosci* 6, 701–710. <https://doi.org/10.1038/ngeo1765>
- Morimoto, T., Murakami, N., Nagatsu, A., Sakakibara, J., 1993. Studies on Glycolipids. VII. Isolation of Two New Sulfoquinovosyl Diacylglycerols from the Green Alga *Chlorella vulgaris*. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 1545–1548. <https://doi.org/10.1248/cpb.41.1545>
- Mouritsen, O.G., 2005. *Life - As a Matter of Fat: the Emerging Science of Lipidomics*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg & Co. KG, Dordrecht.
- Müller, F., Frentzen, M., 2001. Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 509, 298–302. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03163-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03163-5)
- Murakami, H., Nobusawa, T., Hori, K., Shimojima, M., Ohta, H., 2018. Betaine Lipid Is Crucial for Adapting to Low Temperature and Phosphate Deficiency in *Nannochloropsis*. *Plant Physiol.* pp.01573.2017. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01573>
- Murata, N., Yamaya, J., 1984. Temperature-Dependent Phase Behavior of Phosphatidylglycerols from Chilling-Sensitive and Chilling-Resistant Plants. *Plant Physiol.* 74, 1016–1024. <https://doi.org/10.1104/pp.74.4.1016>

N

- Nagatomo, N., Yoshimoto, M., 2019. High Permeability of Polyunsaturated Lipid Bilayers As Applied to Attoliter Enzyme Reactors. *ACS Appl. Bio Mater.* 2, 2453–2463. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00165>
- Nägeli, K.W., Cramer, K.E., 1855. *Pflanzenphysiologische Untersuchungen "Plant physiological studies,"* Zürich, F. Schulthess. ed.
- Nagle, J.F., Tristram-Nagle, S., 2000. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1469, 159–195. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00016-2)
- Nakamura, Y., 2021. Headgroup biosynthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in seed plants. *Progress in Lipid Research* 82, 101091. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101091>
- Naumann, I., Klein, B.C., Bartel, S.J., Darsow, K.H., Buchholz, R., Lange, H.A., 2011. Identification of sulfoquinovosyldiacylglycerides from *Phaeodactylum tricorutum* by matrix-assisted laser desorption/ionization QTrap time-of-flight hybrid mass spectrometry: Sulfoquinovosyldiacylglycerides from *Phaeodactylum tricorutum*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2517–2523. <https://doi.org/10.1002/rcm.5137>
- Navarro-Retamal, C., Bremer, A., Ingólfsson, H.I., Alzate-Morales, J., Caballero, J., Thalhammer, A., González, W., Hinch, D.K., 2018. Folding and Lipid Composition Determine Membrane Interaction of the Disordered Protein COR15A. *Biophysical Journal* 115, 968–980. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.014>
- Nichols, B.W., Appleby, R.S., 1969. The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae. *Phytochemistry* 8, 1907–1915. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88075-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88075-9)
- Nitenberg, M., Makshakova, O., Rocha, J., Perez, S., Maréchal, E., Block, M.A., Girard-Egrot, A., Breton, C., 2020. Mechanism of activation of plant monogalactosyldiacylglycerol synthase 1 (MGD1) by phosphatidylglycerol. *Glycobiology* 30, 396–406. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz106>
- Noack, L.C., Jaillais, Y., 2020. Functions of Anionic Lipids in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 71–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-081519-035910>

O

- Ötles, S., Pire, R., 2001. Fatty Acid Composition of *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae Species. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 84, 1708–1714. <https://doi.org/10.1093/jaoac/84.6.1708>

P

- Páli, T., Németh, B., Pesti, M., 1996. Phase Transition of Membrane Lipids, in: Prasad, R. (Ed.), *Manual on Membrane Lipids*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 80–111. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79837-5_5
- Pan, J., Heberle, F.A., Carmichael, J.R., Ankner, J.F., Katsaras, J., 2012. Time-of-flight Bragg scattering from aligned stacks of lipid bilayers using the Liquids Reflectometer at the Spallation Neutron Source. *J Appl Crystallogr* 45, 1219–1227. <https://doi.org/10.1107/S0021889812039945>
- Pan, J., Marquardt, D., Heberle, F.A., Kučerka, N., Katsaras, J., 2014. Revisiting the bilayer structures of fluid phase phosphatidylglycerol lipids: Accounting for exchangeable hydrogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 2966–2969. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.009>
- Parsegian, V.A., Rand, R.P., 1995. Interaction in Membrane Assemblies, in: *Handbook of Biological Physics*. Elsevier, pp. 643–690. [https://doi.org/10.1016/S1383-8121\(06\)80006-0](https://doi.org/10.1016/S1383-8121(06)80006-0)
- Pascher, I., Sundell, S., Harlos, K., Eibl, H., 1987. Conformation and packing properties of membrane lipids: The crystal structure of sodium dimyristoylphosphatidylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 896, 77–88. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(87\)90358-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(87)90358-0)

- Patrick Williams, W., Cunningham, B.A., Wolfe, D.H., Derbyshire, G.E., Mant, G.R., Bras, W., 1996. A combined SAXS/WAXS investigation of the phase behaviour of di-polyenoic membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1284, 86–96. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(96\)00117-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(96)00117-4)
- Petrache, H.I., Dodd, S.W., Brown, M.F., 2000. Area per Lipid and Acyl Length Distributions in Fluid Phosphatidylcholines Determined by ²H NMR Spectroscopy. *Biophysical Journal* 79, 3172–3192. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76551-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76551-9)
- Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L.-J., Bastien, O., Rébeillé, F., Jouhet, J., Falconet, D., Block, M.A., McFadden, G.I., Bowler, C., Botté, C., Maréchal, E., 2014. Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways – From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research* 54, 68–85. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.02.001>
- Phan, M.D., Shin, K., 2015. Effects of Cardiolipin on Membrane Morphology: A Langmuir Monolayer Study. *Biophysical Journal* 108, 1977–1986. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.03.026>
- Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L.-A., Ferreira, T., Gautier, R., Goud, B., Antonny, B., Barelli, H., 2014. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science* 345, 693–697. <https://doi.org/10.1126/science.1255288>
- Platre, M.P., Noack, L.C., Doumane, M., Bayle, V., Simon, M.L.A., Maneta-Peyret, L., Fouillen, L., Stanislas, T., Armengot, L., Pejchar, P., Caillaud, M.-C., Potocký, M., Čopič, A., Moreau, P., Jaillais, Y., 2018. A Combinatorial Lipid Code Shapes the Electrostatic Landscape of Plant Endomembranes. *Developmental Cell* 45, 465–480.e11. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.04.011>
- Pohland, A.-C., Schneider, D., 2019. Mg²⁺ homeostasis and transport in cyanobacteria – at the crossroads of bacterial and chloroplast Mg²⁺ import. *Biological Chemistry* 400, 1289–1301. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0476>
- Poirier, Y., Thoma, S., Somerville, C., Schiefelbein, J., 1991. A Mutant of Arabidopsis Deficient in Xylem Loading of Phosphate 97, 7.
- Puigbo, P., Guzman, E., Romeu, A., Garcia-Vallve, S., 2007. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 35, W126–W131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm219>
- Pysznik, A.M., Gibbs, S.P., 1992. Immunocytochemical localization of photosystem I and the fucoxanthin-chlorophylla/c light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Protoplasma* 166, 208–217. <https://doi.org/10.1007/BF01322783>

Q

- Quinn, P.J., Lis, L.J., 1991. Dynamic X-Ray Diffraction Studies of Phase Transitions in Lipid-Water Systems, in: Gomez-Fernandez, J.C., Chapman, D., Packer, L. (Eds.), *Progress in Membrane Biotechnology*. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 12–29. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7454-0_2

R

- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlege, R.E., Boore, J.L., Posewitz, M.C., 2012. Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat Commun* 3, 686. <https://doi.org/10.1038/ncomms1688>
- Rand, R.P., Parsegian, V.A., 1989. Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 988, 351–376. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(89\)90010-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(89)90010-5)
- Ray, S., Scott, J.L., Tatulian, S.A., 2007. Effects of Lipid Phase Transition and Membrane Surface Charge on the Interfacial Activation of Phospholipase A₂. *Biochemistry* 46, 13089–13100. <https://doi.org/10.1021/bi7015102>
- Richard, D., Ferrand, M., Kearley, G.J., 1996. Analysis and visualisation of neutron-scattering data. *J. of Neutron Res.* 4, 33–39. <https://doi.org/10.1080/10238169608200065>
- Riekhof, W.R., Naik, S., Bertrand, H., Benning, C., Voelker, D.R., 2014. Phosphate Starvation in Fungi Induces the Replacement of Phosphatidylcholine with the Phosphorus-Free Betaine Lipid Diacylglyceryl-*N*, *N*, *N*-Trimethylhomoserine. *Eukaryot Cell* 13, 749–757. <https://doi.org/10.1128/EC.00004-14>
- Riekhof, W.R., Ruckle, M.E., Lydic, T.A., Sears, B.B., Benning, C., 2003. The Sulfolipids 2'-*O*-Acyl-Sulfoquinovosyldiacylglycerol and Sulfoquinovosyldiacylglycerol Are Absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* Mutant Deleted in *SQD1*. *Plant Physiol.* 133, 864–874. <https://doi.org/10.1104/pp.103.029249>
- Riekhof, W.R., Sears, B.B., Benning, C., 2005. Annotation of Genes Involved in Glycerolipid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the Betaine Lipid Synthase BTA1_{cr}. *Eukaryot Cell* 4, 242–252. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.242-252.2005>
- Risselada, H.J., Marrink, S.J., 2009. Curvature effects on lipid packing and dynamics in liposomes revealed by coarse grained molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 2056. <https://doi.org/10.1039/b818782g>
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Ronquist, F., Klopfstein, S., Vilhelmsen, L., Schulmeister, S., Murray, D.L., Rasnitsyn, A.P., 2012a. A Total-Evidence Approach to Dating with Fossils, Applied to the Early Radiation of the Hymenoptera. *Systematic Biology* 61, 973–999. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys058>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012b. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

- Roughan, P.G., Holland, R., Slack, C.R., 1980. The role of chloroplasts and microsomal fractions in polar-lipid synthesis from [1-14C]acetate by cell-free preparations from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Biochemical Journal* 188, 17–24. <https://doi.org/10.1042/bj1880017>
- Rumak, I., Gieczewska, K., Kierdaszuk, B., Gruszecki, W.I., Mostowska, A., Mazur, R., Garstka, M., 2010. 3-D modelling of chloroplast structure under (Mg²⁺) magnesium ion treatment. Relationship between thylakoid membrane arrangement and stacking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797, 1736–1748. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.07.001>

S

- Sakurai, K., Mori, N., Sato, N., 2014. Detection and characterization of phosphatidylcholine in various strains of the genus *Chlamydomonas* (Volvocales, Chlorophyceae). *J Plant Res* 127, 641–650. <https://doi.org/10.1007/s10265-014-0644-0>
- Salditt, T., 2005. Thermal fluctuations and stability of solid-supported lipid membranes. *J. Phys.: Condens. Matter* 17, R287–R314. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/17/6/R02>
- Salvador-Castell, M., Demé, B., Oger, P., Peters, J., 2020. Structural Characterization of an Archaeal Lipid Bilayer as a Function of Hydration and Temperature. *IJMS* 21, 1816. <https://doi.org/10.3390/ijms21051816>
- Sarkis, J., Rocha, J., Maniti, O., Jouhet, J., Vié, V., Block, M.A., Breton, C., Maréchal, E., Girard-Egrot, A., 2014. The influence of lipids on MGD1 membrane binding highlights novel mechanisms for galactolipid biosynthesis regulation in chloroplasts. *FASEB j.* 28, 3114–3123. <https://doi.org/10.1096/fj.14-250415>
- Sato, N., 2004. Roles of the acidic lipids sulfoquinovosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol in photosynthesis: their specificity and evolution. *J Plant Res* 117, 495–505. <https://doi.org/10.1007/s10265-004-0183-1>
- Sato, N., 1992. Betaine lipids. *Bot Mag Tokyo* 105, 185–197. <https://doi.org/10.1007/BF02489414>
- Sato, N., Hagio, M., Wada, H., Tsuzuki, M., 2000. Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. *Biochemical Society Transactions* 28, 912–914. <https://doi.org/10.1042/bst0280912>
- Sato, N., Murata, N., 1991. Transition of lipid phase in aqueous dispersions of diacylglyceryltrimethylhomoserine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1082, 108–111. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90306-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90306-3)
- Scala, S., Bowler, C., 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology: CMLS. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1666–1673. <https://doi.org/10.1007/PL00000804>
- Scheu, M., Komorowski, K., Shen, C., Salditt, T., 2021. A stalk fluid forming above the transition from the lamellar to the rhombohedral phase of lipid membranes. *Eur Biophys J* 50, 265–278. <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01493-2>
- Schneck, E., Demé, B., Gege, C., Tanaka, M., 2011. Membrane Adhesion via Homophilic Saccharide-Saccharide Interactions Investigated by Neutron Scattering. *Biophysical Journal* 100, 2151–2159. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.011>
- Schneck, E., Rehfeldt, F., Oliveira, R.G., Gege, C., Demé, B., Tanaka, M., 2008. Modulation of intermembrane interaction and bending rigidity of biomembrane models via carbohydrates investigated by specular and off-specular neutron scattering. *Phys. Rev. E* 78, 061924. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.061924>
- Seddon, J.M., 1990. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1031, 1–69. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90002-T](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90002-T)
- Shahane, G., Ding, W., Palaiokostas, M., Orsi, M., 2019. Physical properties of model biological lipid bilayers: insights from all-atom molecular dynamics simulations. *J Mol Model* 25, 76. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-3964-0>
- Shaikh, S.R., Kinnun, J.J., Leng, X., Williams, J.A., Wassall, S.R., 2015. How polyunsaturated fatty acids modify molecular organization in membranes: Insight from NMR studies of model systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.04.020>
- Sharma, N.K., Rai, A.K., 2011. Biodiversity and biogeography of microalgae: progress and pitfalls. *Environ. Rev.* 19, 1–15. <https://doi.org/10.1139/a10-020>
- Shechter, E., 1984. *Membranes biologiques : structure, transports, bioénergétique.*, Masson, Paris. ed.
- Sheffer, M., Fried, A., Gottlieb, H.E., Tietz, A., Avron, M., 1986. Lipid composition of the plasma-membrane of the halotolerant alga, *Dunaliella salina*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 857, 165–172. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90344-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90344-5)
- Shimajima, M., 2011. Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. *Progress in Lipid Research* 50, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.02.003>
- Shinitzky, M., 1984. Membrane fluidity in malignancy Adversative and recuperative. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 738, 251–261. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(83\)90007-0](https://doi.org/10.1016/0304-419X(83)90007-0)
- Shipley, G., Green, J.P., Nichols, B.W., 1973. The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 311, 531–544. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90128-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90128-4)
- Shockey, J., Regmi, A., Cotton, K., Adhikari, N., Browne, J., Bates, P.D., 2016. Identification of *Arabidopsis* *GPAT9* (At5g60620) as an Essential Gene Involved in Triacylglycerol Biosynthesis. *Plant Physiol.* 170, 163–179. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01563>
- Siegel, D.P., Tenchov, B.G., 2008. Influence of the Lamellar Phase Unbinding Energy on the Relative Stability of Lamellar and Inverted Cubic Phases. *Biophysical Journal* 94, 3987–3995. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.118034>

- Simon, M.L.A., Platre, M.P., Marquès-Bueno, M.M., Armengot, L., Stanislas, T., Bayle, V., Caillaud, M.-C., Jaillais, Y., 2016. A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. *Nature Plants* 2, 16089. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.89>
- Simopoulos, A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56, 365–379. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6)
- Singer, S.D., Chen, G., Mietkiewska, E., Tomasi, P., Jayawardhane, K., Dyer, J.M., Weselake, R.J., 2016. Arabidopsis GPAT9 contributes to synthesis of intracellular glycerolipids but not surface lipids. *EXBOTJ* 67, 4627–4638. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw242>
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175, 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Sinha, S.K., Sirota, E.B., Garoff, S., Stanley, H.B., 1988. X-ray and neutron scattering from rough surfaces. *Phys. Rev. B* 38, 2297–2311. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.38.2297>
- Skarjune, R., Oldfield, E., 1982. Physical studies of cell surface and cell membrane structure. Deuterium nuclear magnetic resonance studies of N-palmitoylglucosylceramide (cerebroside) head group structure. *Biochemistry* 21, 3154–3160. <https://doi.org/10.1021/bi00256a019>
- Smith, R., Jouhet, J., Gandini, C., Nekrasov, V., Marechal, E., Napier, J.A., Sayanova, O., 2021. Plastidial acyl carrier protein Δ9-desaturase modulates eicosapentaenoic acid biosynthesis and triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant J* 106, 1247–1259. <https://doi.org/10.1111/tpj.15231>
- Smutzer, G., Yeagle, P.L., 1985. A fluorescence anisotropy study on the phase behavior of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 814, 274–280. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90445-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90445-6)
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stachura, S.S., Malajczuk, C.J., Kuprusevicius, E., Mancera, R.L., 2019. Influence of Bilayer Size and Number in Multi-Bilayer DOPC Simulations at Full and Low Hydration. *Langmuir* 35, 2399–2411. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03212>
- Staehelein, L.A., 2003. Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* 76, 185–196. <https://doi.org/10.1023/A:1024994525586>

T

- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønberg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., Jahn, R., 2006. Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* 127, 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Tanoue, R., Kobayashi, M., Katayama, K., Nagata, N., Wada, H., 2014. Phosphatidylglycerol biosynthesis is required for the development of embryos and normal membrane structures of chloroplasts and mitochondria in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 588, 1680–1685. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.010>
- Tardieu, A., Luzzati, V., Reman, F.C., 1973. Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids : A Study of Lecithin-Water Phases. *Journal of Molecular Biology* 75, 26. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90303-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90303-3)
- Tenchov, B., Koynova, R., 2012. Cubic phases in membrane lipids. *Eur Biophys J* 41, 841–850. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0819-3>
- The Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Thuynsma, R., Kleinert, A., Kossmann, J., Valentine, A.J., Hills, P.N., 2016. The effects of limiting phosphate on photosynthesis and growth of *Lotus japonicus*. *South African Journal of Botany* 104, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.001>
- Tixier-Vidal, A., Picart, R., Loudes, C., Bauman, A.F., 1986. Effects of polyunsaturated fatty acids and hormones on synaptogenesis in serum-free medium cultures of mouse fetal hypothalamic cells. *Neuroscience* 17, 115–132. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90230-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90230-7)

U

- Ullmann, A., Jacob, F., Monod, J., 1967. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 24, 339–343. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90341-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90341-5)

V

- van der Meer, B.W., van Hoeven, R.P., van Blitterswijk, W.J., 1986. Steady-state fluorescence polarization data in membranes. Resolution into physical parameters by an extended Perrin equation for restricted rotation of fluorophores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 854, 38–44. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90062-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90062-3)
- van Hoek, A., Vos, K., Visser, A.J.W.G., 1987. Ultrasensitive time-resolved polarized fluorescence spectroscopy as a tool in biology and medicine. *IEEE Journal of Quantum Electronics* 23, 1812–1820.

- Van Mooy, B.A.S., Fredricks, H.F., Pedler, B.E., Dyhrman, S.T., Karl, D.M., Koblížek, M., Lomas, M.W., Mincer, T.J., Moore, L.R., Moutin, T., Rappé, M.S., Webb, E.A., 2009. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* 458, 69–72. <https://doi.org/10.1038/nature07659>
- Van Mooy, B.A.S., Rocap, G., Fredricks, H.F., Evans, C.T., Devol, A.H., 2006. Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 8607–8612. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600540103>
- Vance, J., Steenbergen, R., 2005. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research* 44, 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.05.001>
- Vieler, A., Wu, G., Tsai, C.-H., Bullard, B., Cornish, A.J., Harvey, C., Reca, I.-B., Thornburg, C., Achawanantakun, R., Buehl, C.J., Campbell, M.S., Cavalier, D., Childs, K.L., Clark, T.J., Deshpande, R., Erickson, E., Armenia Ferguson, A., Handee, W., Kong, Q., Li, X., Liu, B., Lundback, S., Peng, C., Roston, R.L., Sanjaya, Simpson, J.P., TerBush, A., Warakanont, J., Zäuner, S., Farre, E.M., Hegg, E.L., Jiang, N., Kuo, M.-H., Lu, Y., Niyogi, K.K., Ohlrogge, J., Osteryoung, K.W., Shachar-Hill, Y., Sears, B.B., Sun, Y., Takahashi, H., Yandell, M., Shiu, S.-H., Benning, C., 2012. Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genet* 8, e1003064. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003064>
- Vogel, G., 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*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078271>

W

- Wang, D., Lv, S., Jiang, P., Li, Y., 2017. Roles, Regulation, and Agricultural Application of Plant Phosphate Transporters. *Front. Plant Sci.* 8, 817. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00817>
- Wang, K., Durrett, T.P., Benning, C., 2019. Functional diversity of glycerolipid acylhydrolases in plant metabolism and physiology. *Progress in Lipid Research* 75, 100987. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.100987>
- Warakanont, J., Tsai, C., Michel, E.J.S., Murphy, G.R., Hsueh, P.Y., Roston, R.L., Sears, B.B., Benning, C., 2015. Chloroplast lipid transfer processes in *Chlamydomonas reinhardtii* involving a TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 2 (TGD 2) orthologue. *Plant J* 84, 1005–1020. <https://doi.org/10.1111/tpj.13060>
- Wiedmann, T., Salmon, A., Wong, V., 1993. Phase behavior of mixtures of DPPC and POPG. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1167, 114–120. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(93\)90150-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(93)90150-8)
- Wolde-Kidan, A., Pham, Q.D., Schlaich, A., Loche, P., Sparr, E., Netz, R.R., Schneck, E., 2019. Influence of polar co-solutes and salt on the hydration of lipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21, 16989–17000. <https://doi.org/10.1039/C9CP01953G>
- Wood, W.H.J., MacGregor-Chatwin, C., Barnett, S.F.H., Mayneord, G.E., Huang, X., Hobbs, J.K., Hunter, C.N., Johnson, M.P., 2018. Dynamic thylakoid stacking regulates the balance between linear and cyclic photosynthetic electron transfer. *Nature Plants* 4, 116–127. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0092-7>
- Worcester, D.L., Franks, N.P., 1976. Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol bilayers II. Neutron diffraction. *Journal of Molecular Biology* 100, 359–378. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(76\)80068-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(76)80068-X)
- Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F., Deng, X.W., 2003. Phosphate Starvation Triggers Distinct Alterations of Genome Expression in Arabidopsis Roots and Leaves. *Plant Physiology* 132, 1260–1271. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021022>

X

- Xu, C., Moellering, E.R., Muthan, B., Fan, J., Benning, C., 2010. Lipid Transport Mediated by Arabidopsis TGD Proteins is Unidirectional from the Endoplasmic Reticulum to the Plastid. *Plant and Cell Physiology* 51, 1019–1028. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq053>
- Xu, C., Yu, B., Cornish, A.J., Froehlich, J.E., Benning, C., 2006. Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of Arabidopsis mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3- phosphate acyltransferase. *The Plant Journal* 47, 296–309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02790.x>

Y

- Yang, H.-J., Sugiura, Y., Ikegami, K., Konishi, Y., Setou, M., 2012. Axonal Gradient of Arachidonic Acid-containing Phosphatidylcholine and Its Dependence on Actin Dynamics. *Journal of Biological Chemistry* 287, 5290–5300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316877>
- Yang, M., Jiang, J.-P., Xie, X., Chu, Y.-D., Fan, Y., Cao, X.-P., Xue, S., Chi, Z.-Y., 2017. Chloroplasts Isolation from *Chlamydomonas reinhardtii* under Nitrogen Stress. *Front. Plant Sci.* 8, 1503. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01503>
- Yazawa, H., Iwashashi, H., Kamisaka, Y., Kimura, K., Uemura, H., 2009. Production of polyunsaturated fatty acids in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to alkaline pH tolerance. *Yeast* 26, 167–184. <https://doi.org/10.1002/yea.1659>
- Yoshihara, A., Nagata, N., Wada, H., Kobayashi, K., 2021. Plastid Anionic Lipids Are Essential for the Development of Both Photosynthetic and Non-Photosynthetic Organs in Arabidopsis thaliana. *IJMS* 22, 4860. <https://doi.org/10.3390/ijms22094860>

- Yu, B., Benning, C., 2003. Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 36, 762–770. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01918.x>
- Yu, B., Wakao, S., Fan, J., Benning, C., 2004. Loss of Plastidic Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Causes Embryo-Lethality in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 45, 503–510. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch064>
- Yu, B., Xu, C., Benning, C., 2002. *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 5732–5737. <https://doi.org/10.1073/pnas.082696499>

Z

- Zäuner, S., Jochum, W., Bigorowski, T., Benning, C., 2012. A Cytochrome *b*₅-Containing Plastid-Located Fatty Acid Desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 11, 856–863. <https://doi.org/10.1128/EC.00079-12>
- Zhao, L.-S., Li, K., Wang, Q.-M., Song, X.-Y., Su, H.-N., Xie, B.-B., Zhang, X.-Y., Huang, F., Chen, X.-L., Zhou, B.-C., Zhang, Y.-Z., 2017. Nitrogen Starvation Impacts the Photosynthetic Performance of *Porphyridium cruentum* as Revealed by Chlorophyll a Fluorescence. *Sci Rep* 7, 8542. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08428-6>
- Zhao, W., Róg, T., Gurtovenko, A.A., Vattulainen, I., Karttunen, M., 2007. Atomic-Scale Structure and Electrostatics of Anionic Palmitoyloleoylphosphatidylglycerol Lipid Bilayers with Na⁺ Counterions. *Biophysical Journal* 92, 1114–1124. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.086272>
- Zhou, Y., Peisker, H., Dörmann, P., 2016. Molecular species composition of plant cardiolipin determined by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* 57, 1308–1321. <https://doi.org/10.1194/jlr.D068429>
- Zimorski, V., Ku, C., Martin, W.F., Gould, S.B., 2014. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology* 22, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.008>
- Zulu, N.N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., Feussner, I., 2018. Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research* 70, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001>

Rôle des lipides non-phosphorés dans l'architecture des membranes des plantes et des microalgues.

Dans le cadre actuel des transitions écologiques et énergétiques, les microalgues sont de plus en plus étudiées pour leur forte teneur en lipides, pouvant être utilisés pour la fabrication de biocarburants. Mais les connaissances sur le métabolisme des microalgues sont encore limitées. Les plantes supérieures et les microalgues, bien qu'habitant dans des endroits distincts, sont soumises à des contraintes environnementales, comme la carence en phosphate (Pi), un macronutriment essentiel pour leur développement. Pour pallier à cette carence, les plantes et les microalgues modifient la composition lipidique de leurs membranes afin de remobiliser le phosphate présent dans les phospholipides. C'est pourquoi, de nombreuses données de la littérature observent une augmentation des lipides non-phosphorés pour remplacer et compenser une diminution des phospholipides. Il est connu que le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) remplace le phosphatidylglycérol (PG), que le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) remplace phosphatidylcholine (PC), et chez les microalgues que les bêtaines lipides semblent remplacer la PC. Est-ce que le remplacement de chaque phospholipide par un lipide non-phosphoré est lié à leur propriété structurale similaire dans la membrane ? C'est dans ce cadre de recherche fondamentale sur la compréhension des remaniements lipidiques que s'inscrit ce travail de thèse.

L'utilisation de la diffraction des neutrons sur des films de lipides est un outil puissant permettant de déterminer de nombreux paramètres structuraux des membranes, comme leur organisation, leur épaisseur et celle de la couche d'eau entre les membranes, ainsi que leur rigidité et leur compressibilité. Dans ce projet, nous avons pu montrer que le PG et le SQDG ont des propriétés biophysiques très similaires expliquant leur interchangeabilité lors de la carence en phosphate. Ensuite, nous avons essayé d'apporter une réponse à la déformation de l'enveloppe du chloroplaste observée chez les plantes en carence, qui semblerait en lien avec l'augmentation du DGDG dans les membranes. Les résultats laissent supposer que le DGDG rend les membranes plus souples et favorise leur juxtaposition, mais les données sont encore insuffisantes pour pouvoir conclure avec certitude. Nous avons ensuite mis en lumière que les propriétés du DGTS (1,2-diacylglycéryl-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homosérine), présents chez les microalgues, sont différentes de celles de la PC, avec notamment une bicouche plus épaisse et une répulsion entre bicouches plus forte, qui pourraient expliquer son absence dans les membranes des plantes à graines. Les plantes n'ayant pas la même composition en acides gras que les microalgues, riches en acides gras en C20 et portant jusqu'à 5 insaturations, ne seraient pas capables de contrebalancer les effets de la tête polaire des bêtaines lipides. Un lien étroit entre la composition en acides gras et la présence des bêtaines lipides dans l'organisme semble donc se dégager. Enfin, chez certaines microalgues, la présence de l'acyl-SQDG (ASQD) dans les membranes pourrait favoriser l'accolement des membranes et donc l'empilement des thylakoïdes dans le chloroplaste. Mais les données obtenues ne nous permettent pas encore de valider cette hypothèse. Ainsi, l'étude des lipides et membranes par une approche physique nous a permis d'apporter des éléments de réponses à des questions biologiques, permettant d'améliorer notre compréhension des remodelages lipidiques chez les plantes et les microalgues lors de la carence en phosphate.

Mots clés : Microalgues, carence en phosphate, lipides, architecture des membranes, diffraction des neutrons

Role of non-phosphorus lipids in the architecture of plant and microalgae membranes

In the current context of ecological and energy transitions, microalgae are increasingly studied for their high lipid content, which can be used to produce biofuels. However, knowledge about the metabolism of microalgae is still limited. Higher plants and microalgae, although living in different places, are subject to environmental constraints, such as a lack of phosphate (Pi), a macronutrient essential for their development. To compensate for this deficiency, plants and microalgae modify the lipid composition of their membranes in order to remobilise the phosphate present in the phospholipids. This is why many data in the literature show an increase in non-phosphorus lipids to replace and compensate for a decrease in phospholipids. It is known that sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) replaces phosphatidylglycerol (PG), that digalactosyldiacylglycerol (DGDG) replaces phosphatidylcholine (PC), and in microalgae that lipid betaines appear to replace PC. Is the replacement of each phospholipid by a non-phosphorus lipid related to their similar structural properties in the membrane? It is within this framework of fundamental research into the understanding of lipid rearrangements that this thesis work is situated.

The use of neutron diffraction on lipid films is a powerful tool to determine many structural parameters of the membranes, such as their organisation, thickness and thickness of the water layer between the membranes, as well as their stiffness and compressibility. In this project, we were able to show that PG and SQDG have very similar biophysical properties explaining their interchangeability during phosphate deficiency. Secondly, we tried to find an answer to the deformation of the chloroplast envelope observed in deficient plants, which seems to be related to the increase of DGDG in the membranes. The results suggest that DGDG makes the membranes more flexible and promotes their juxtaposition, but there is still insufficient data to conclude with certainty. We then highlighted that the properties of DGTS (1,2-diacylglyceryl-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine), present in microalgae, are different from those of CP, including a thicker bilayer and stronger interlayer repulsion, which could explain its absence in seed plant membranes. Plants with a different fatty acid composition than microalgae, rich in C20 fatty acids and carrying up to 5 unsaturations, would not be able to counteract the effects of the polar head of the lipid betaines. A close link between the fatty acid composition and the presence of betaine lipids in the organism thus seems to emerge. Finally, in some microalgae, the presence of acyl-SQDG (ASQD) in the membranes could favour the docking of the membranes and thus the stacking of thylakoids in the chloroplast. However, the data obtained do not yet allow us to validate this hypothesis. Thus, the study of lipids and membranes using a physical approach has enabled us to provide answers to biological questions, thus improving our understanding of lipid remodelling in plants and microalgae during phosphate deficiency.

Keywords: Microalgae, phosphate starvation, lipids, membrane architecture, neutron diffraction

CEA Grenoble

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale – UMR 5168 CEA/CNRS/Université Grenoble Alpes – UMR
1417 INRA

17 avenue des Martyrs

38054 Grenoble cedex 9

&

Institut Laue Langevin

71 avenue des Martyrs

38042 Grenoble cedex 9