



**HAL**  
open science

# Fonction de la protéine Seipin dans la biogénèse des gouttelettes lipidiques chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*

Damien Le Moigne

► **To cite this version:**

Damien Le Moigne. Fonction de la protéine Seipin dans la biogénèse des gouttelettes lipidiques chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*. *Biologie végétale*. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV110 . tel-04625477

**HAL Id: tel-04625477**

**<https://theses.hal.science/tel-04625477>**

Submitted on 26 Jun 2024

**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**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biologie Végétale

Unité de recherche : LPCV - Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale

## **Fonction de la protéine Seipin dans la biogénèse des gouttelettes lipidiques chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum***

## **Function of the Seipin protein during lipid droplet biogenesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum***

Présentée par :

**Damien LE MOIGNE**

Direction de thèse :

**Juliette SALVAING**  
Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

**Eric MARECHAL**  
Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

**Xavier PRIEUR**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Nantes

**Philippe SOUDANT**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Bretagne et Pays de la Loire

Thèse soutenue publiquement le **18 décembre 2023**, devant le jury composé de :

**Corinne MERCIER,**  
PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Présidente

**Juliette SALVAING,**  
CHARGÉE DE RECHERCHE HDR, INRAE Lyon-Grenoble Auvergne-Rhône-Alpes

Directrice de thèse

**Eric MARECHAL,**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

Co-directeur de thèse

**Xavier PRIEUR,**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Nantes

Rapporteur

**Philippe SOUDANT,**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Bretagne et Pays de la Loire

Rapporteur

**Yonghua LI-BEISSON,**  
INGENIEURE HDR, CEA centre de Cadarache

Examinatrice





*À mon grand-père*



*« Ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement,  
Et les mots pour le dire arrivent aisément »*

**Nicolas Boileau-Despréaux**

L'Art poétique (1674)



## Remerciements

Il est temps de conclure ce manuscrit par des remerciements. Conclure, car c'est la dernière partie que j'écris mais curieusement la première qui sera lue par le plus grand nombre. Par crainte d'oublier des gens, je l'ai repoussée jusqu'au bout, mais je me lance, enfin !

Dans un premier temps, j'aimerais remercier très chaleureusement mes directeurs de thèse, Juliette Salvaing et Eric Maréchal pour ce formidable sujet sur lequel vous m'avez permis de travailler pendant trois très belles années ; je ne les ai pas vu passer. Merci beaucoup Juliette pour la confiance que tu m'as accordée, pour les nombreux conseils au quotidien ainsi que pour ton engouement à chaque nouveau résultat : d'une transformation réussie à des supers résultats de lipides ou de belles images ramenées du confocal. Merci Eric de prendre à chaque fois le temps d'expliquer de manière limpide, des concepts pourtant compliqués. Merci à tous les deux de m'avoir permis de participer et présenter mes résultats dans des conférences passionnantes ainsi que pour les nombreuses corrections que vous avez apportées à ce manuscrit.

J'aimerais remercier dans un second temps, les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ces travaux. Monsieur Xavier Prieur et Monsieur Philippe Soudant en qualité de rapporteurs, Madame Corinne Mercier et Madame Yonghua Li-Beisson en qualité d'examinatrices. J'en profite pour remercier Yonghua et mes deux autres membres de CSI, Sabine D'Andréa et Maria Helena Cruz de Carvalho pour les nombreux conseils et pour l'intérêt que vous avez sans cesse manifesté pour nos travaux.

Ma gratitude va ensuite à tous les membres de l'équipe Lipides dont l'aide a été plus que déterminante dans l'aboutissement de ces travaux : un très grand merci à Juliette Jouhet pour tous les échantillons de lipides passés en spectrométrie de masse – on ne les compte plus – avant d'être aidée par Marion Schilling, Mathilde Louwagie et Mathilde Cussac. La plateforme de Lipides ne serait rien sans vous. Merci Juliette pour ton expertise en lipides et pour ta patience à nous expliquer et réexpliquer toutes ces voies et leur complexité. J'aimerais ensuite remercier très sincèrement Catherine Albrieux pour m'avoir pris sous son aile et pour avoir assisté le novice que j'étais en biochimie. Je n'aurai pas été capable de maîtriser aussi rapidement les extractions de lipides ou de protéines et je n'aurai sûrement jamais été capable de maîtriser seul les purifications de gouttelettes lipidiques sans ton aide. Merci à Valérie Gros pour avoir effectué plusieurs extractions de lipides et plusieurs fois assisté lorsque le robot de méthanolyse faisait des siennes. Un très grand merci à Morgane Michaud qui a tout le temps répondu à mes questions sur les cultures de levure, les agro-infiltrations, l'extraction de protéines et la biochimie de manière générale. Merci également Nolwenn Gueguen pour m'avoir montré comment fonctionnait le labo à mon arrivée, notamment en



culture d'algues : ta *Phaeodactylum* pyrogravée trône sur mon bureau. Dans toutes les personnes qui m'ont assistées au labo, je n'oublie pas nos super microscopistes Denis Falconet et Gregory Si Larbi. Denis, tu as une manière très juste de voir les choses, un émerveillement touchant associé à une soif de découverte et surtout, de faire découvrir. Merci Alberto Amato et Olivier Bastien pour votre implication dans notre phylogénie sur la Seipin, vous y avez tous les deux contribué de manière significative. C'est toujours un immense plaisir de parler avec vous, de sciences pures et de tout le reste. Merci à Chems Amari pour les nombreuses heures passées à développer ces formidables scripts de comptages de LD. Chapeau l'artiste.

J'aimerai ensuite remercier tous les étudiants que j'ai eu la chance de co-encadrer. Mattéo Arrighi, tu as été le premier et ton naturel m'a permis de gagner en confiance dans le rôle de l'encadrement sur la partie laboratoire. Merci également à Eugénio Reale pour ta compréhension et ta patience lorsque nous avons découvert tous les deux l'agro-infiltration. Merci Niklas Segerström pour ton autonomie. Et enfin, un immense merci à Francesca Arici qui nous a accompagnés pendant 6 mois, félicitations pour tout le travail que tu as fourni et pour toute l'aide que tu m'as apportée. Ton souci du détail et de comprendre tout ce que tu entreprends m'ont souvent permis d'aller au-delà de mes propres limites. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse.

Tous mes remerciements vont ensuite aux nombreux copains et amis, thésards et non permanents dont j'ai croisé le chemin au labo. La génération présente quand je suis arrivé et qui m'a accueilli dans le bureau 442 : Nolwenn Gueguen, Stéphanie Bolik et Sébastien Leterme. Ne t'inquiètes pas Stéphanie, je n'oublie pas qu'on vit vraiment une drôle d'époque ! Merci beaucoup Sébastien pour ton amitié, nos déjeuners en quatrième vitesse pendant une période peu joyeuse de restrictions post-covid. Merci pour ta curiosité et ton intérêt sur mes résultats, tes conseils de biochimiste endurci et passionné et surtout pour tous les fous rires qu'on a partagés. Un très grand merci à Camille Beaulier pour tout le soutien que nous nous sommes apporté mutuellement dans ces dernières semaines de rédactions. Je vous remercie tous les deux, Elodie Billey et Vincent Nourry. Elodie pour avoir prêté plusieurs fois une oreille attentive autant quand je t'exposais mes projets que lorsque j'expliquais les ACP. Vincent, merci beaucoup pour tous les tours à moto qu'on a fait ensemble et pour m'avoir laissé piloter tes Harley, j'en revenais chaque fois regonflé à bloc. Louise Chambon, il faudra quand même que tu me donnes un jour tes définitions de « cœur pur » et « grande âme ». Fabien Richard, j'espère que la vie parisienne ne t'a pas traumatisé et qu'on te reverra bientôt pas loin de nos montagnes. Merci à Vangeli Geshkovski pour ton encouragement à faire la structure de ma protéine. Je n'ai pas pu la réaliser moi-même, mais c'est en bonne voie. Merci à Jade Ezzedine pour les nombreuses discussions ainsi que pour ton soutien et tes conseils.

J'ai eu l'occasion d'accueillir à mon tour la « deuxième génération » de thésards : Sarah Salomon, merci pour ton caractère doux et posé, je suis très admiratif de ta force de travail et de ton organisation. Yannick Sérès, tes irruptions dans le bureau pour poser une question brûlante vont quand même me manquer. Merci à toi pour maintenir une cohésion entre étudiants, même si je n'ai pas pu y participer autant que je le désirais ces derniers temps. Merci beaucoup Siqi Yan pour les discussions qu'on a eues ainsi que pour ton intérêt sur mes résultats et merci à Siraba Gueye pour ta gentillesse qui te définit si bien. Un grand merci à Pierre Guenzi-Tiberi pour avoir m'avoir plusieurs fois aidé à déboguer des scripts R, ou Python que je ne maîtrisais pas.

J'aimerai également adresser mes remerciements à tous les autres membres de l'équipe Lipides pour lesquels je n'ai pas encore eu l'occasion de le faire : Fabrice Rebeillé, Florence Corellou, Sylvaine Roy, Gaëlle Villain, Sassia Hadjadji, Benjamin Fel, Benitez Tellez Ana-Belèn, Camille Varrel. Un grand merci à Tiffany et Sophie pour m'avoir souvent patiemment réexpliqué le fonctionnement des diverses plateformes que j'ai eu la joie d'utiliser (ah étamines) et protocoles administratifs tordus.

J'aimerai enfin remercier mes parents, mes grands-parents et mon frère qui ont suivi avec la plus grande attention et le plus grand souci, les histoires de ma vie de doctorant. Au-delà de ça, ils ont toujours tout mis en œuvre pour me permettre de mener à bien ce que j'entreprends et je leur en serai toujours très reconnaissant. Merci maman pour les nombreuses corrections sur ce manuscrit.

Mes derniers mots sont pour Wassila qui a été à mes côtés tout au long de cette thèse. Tu as toujours su m'écouter et apprécier ma joie dans les meilleurs moments, trouver les mots pour m'encourager et me soutenir lorsque c'était nécessaire. Merci pour toujours apprécier le bon dans ce que je fais et m'en faire prendre conscience.



# Table des matières

<b>Partie Introduction</b> .....	
<b>Les diatomées</b> .....	<b>2</b>
1 Les diatomées sont une classe majeure dans la diversité du phytoplancton.....	2
1.1 Classification des diatomées .....	2
2 Rôle des diatomées dans l'environnement.....	4
3 Les diatomées sont issues d'une histoire évolutive complexe. ....	6
3.1 Les diatomées sont des endosymbiotes secondaires .....	7
3.2 Les endosymbioses sont à l'origine d'un plaste complexe .....	9
4 Succès écologique des diatomées.....	11
<b>Métabolisme lipidique chez les diatomées.</b> .....	<b>12</b>
1 Les différentes classes de glycérolipides chez les diatomées .....	12
1.1 Structure commune des glycérolipides.....	12
1.2 Les phospholipides .....	13
1.3 Les glycoglycérolipides .....	13
1.4 Bétaïnes lipides.....	14
1.5 Les lipides non polaires .....	15
2 Synthèse des acides gras et des glycérolipides .....	16
2.1 Fixation du carbone par la photosynthèse.....	17
2.2 La synthèse de novo d'acide gras débute dans le plaste. ....	17
2.3 Désaturation des acides gras et élongations extra-plastidiales.....	19
3 Synthèse des glycérolipides.....	20
3.1 Synthèse des lipides plastidiaux : voie procaryote.....	21
3.2 Synthèse des lipides extraplastidiaux : voie eucaryote.....	22
4 Synthèse des TAG.....	23
4.1 Synthèse par les DGAT, voie dépendante de l'acyl-CoA .....	23
4.2 Synthèse des TAG par les voies indépendantes de l'acyl-CoA .....	25
5 Catabolisme des Triacylglycerols.....	26
5.1 Hydrolyse des acides gras.....	26
5.2 Catabolisme des acides gras par la $\beta$ -oxydation .....	27
5.3 Dégradation des LD par autophagie.....	28
<b>Applications industrielles des microalgues</b> .....	<b>30</b>
1 Utilisation de microalgues.....	30
1.1 Dépollution d'eaux usées. ....	30
1.2 Production de biocarburants.....	31
1.3 Autres applications notables .....	32
2 Techniques de cultures industrielles.....	32

3	Expulsion de composés d'intérêt hors de la cellule .....	33
	<b>Les Gouttelettes Lipidiques.....</b>	<b>34</b>
	<b>La protéine Seipin .....</b>	<b>69</b>
1	Etudes fonctionnelles de la Seipin et implication dans la biogenèse des gouttelettes lipidiques. .....	70
1.1	Fonction de la Seipin dans la formation de la LD chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	70
1.2	Implication et fonction de la Seipin dans les modèles animaux et levures .....	73
1.3	Cas particulier des Seipin chez les plantes .....	76
2	Structure de la Seipin .....	78
2.1	Evaluation de la structure de Seipin par des approches biochimiques.....	78
2.2	Résolution à l'échelle moléculaire de la structure du domaine luménal.....	80
2.3	Résolution à l'échelle moléculaire de la structure des domaines transmembranaires ....	82
3	La Seipin recrute spécifiquement des partenaires protéiques .....	84
3.1	Protéine Ldo45 chez la levure et son homologue LDAF1 chez l'Homme.....	84
3.2	LDIP chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	85
4	Vers un modèle de fonctionnement de la Seipin ? .....	86
	<b>Résultats.....</b>	<b>88</b>
	<b>Chapitre 1 : Analyses structurales et phylogénétiques de la Seipin de <i>Phaeodactylum tricornerutum</i></b>	<b>88</b>
1	Analyses <i>in silico</i> de la structure de <i>PtSeipin</i> .....	90
1.1	Analyses de la structure de <i>PtSeipin</i> .....	90
2	Analyses des éléments structuraux spécifiques de <i>PtSeipin</i> .....	96
2.1	Comparaison par alignements de séquences protéiques .....	96
3	Mise en perspective de la Seipin des diatomées dans l'arbre du vivant. ....	98
3.1	Identification de motifs conservés .....	98
3.2	Phylogénie moléculaire .....	99
4	Mise en évidence d'une oligomérisation de <i>PtSeipin</i> .....	102
4.1	Prédiction d'une structure en dimère par AlphaFold-Multimer .....	102
4.2	Détection d'oligomères de <i>PtSeipin</i> après expression en système <i>in vitro</i> .....	104
5	Discussion et conclusions du Chapitre 1. ....	105
	<b>Chapitre 2 : Analyse fonctionnelle de la Seipin de <i>Phaeodactylum tricornerutum</i> .....</b>	<b>108</b>
1	Complémentation fonctionnelle de levures invalidées génétiquement pour la Seipin.....	110
1.1	Validation de l'expression protéique de Seipin <i>in vivo</i> .....	111
1.2	Croissance des levures complémentées .....	112
1.3	Caractérisations microscopiques des LD dans les lignées Ylr404w complémentées.....	112
1.4	Composition lipidique des lignées.....	114
1.5	Conclusion de la complémentation fonctionnelle chez la levure .....	118

2	Localisation de <i>PtSeipin</i> in vivo chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	119
2.1	Observations microscopiques .....	119
3	Phénotype des mutants <i>Phaeodactylum tricornutum</i> invalidés génétiquement ou surexprimant la Seipin en conditions de culture normales. ....	122
3.1	Paramètres morphologiques des cellules .....	122
3.2	Suivi des cultures par mesure de la croissance cellulaire .....	124
3.3	Impact de la mutation Seipin sur la morphologie des LD.....	125
4	Phénotype des mutants <i>Phaeodactylum tricornutum</i> invalidés génétiquement et soumis à un stress lumineux.....	129
4.1	Suivi de la croissance des cultures .....	129
4.2	Sensibilité des mutants Seipin à un stress lumineux.....	130
5	Impact de la mutation Seipin sur le glycérolipidome de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en conditions normales ou de stress lumineux.....	136
5.1	Profils des chaînes d'acides gras chez les mutants KO Seipin .....	137
5.2	Profils des classes de glycérolipides .....	139
5.3	Profils des espèces de lipides .....	142
6	Impact du stress nutritionnel à travers une carence en phosphate chez les mutants KO Seipin. ....	147
6.1	Profils des glycérolipides totaux en carence en phosphate.....	148
6.2	Observations en microscopie électronique.....	149
7	Expulsion de gouttelettes lipidiques chez les mutants Seipin.....	150
7.1	Observation de gouttelettes lipidiques libres dans le milieu de culture.....	150
7.2	Observation de l'expulsion de gouttelettes lipidiques hors de la cellule .....	151
7.3	Analyses lipidiques du surnageant de culture.....	152
8	Répartition anormale des LD lors de la division cellulaire .....	152
9	Discussion et conclusion du Chapitre 2.....	154
9.1	Impact de <i>PtSeipin</i> sur le métabolisme lipidique .....	155
9.2	Impact de la Seipin sur l'orchestration de la division des LD au cours de la mitose.....	156
9.3	Perspectives d'applications industrielles. ....	157
<b>Chapitre 3 : Fractionnement, analyse des profils lipidomiques et protéomiques des LD chez les mutants Seipin. ....</b>		<b>158</b>
1	Purification des LD.....	160
1.1	Validation de la purification .....	161
2	Analyses lipidomiques des LD purifiées .....	161
2.1	Profils des glycérolipides .....	162
3	Analyses protéomiques des LD purifiées, approches biochimiques .....	163
3.1	Colorations au nitrate d'argent.....	163
3.2	Immunodétection sur membrane .....	164

4	Analyses protéomiques des LD purifiées par spectrométrie de masse.....	166
4.1	Nombre de protéines détectées par spectrométrie de masse.....	166
4.2	Les différences de composition les plus importantes sont liées aux conditions de culture. .....	167
4.3	Etude comparative de l'abondance relative de protéines chez le mutant Seipin. ....	170
4.4	Conclusion sur les études de protéomiques .....	183
5	Remobilisation des LD en sortie de carence nutritionnelle. ....	184
5.1	Les mutants Seipin présentent des troubles dans la remobilisation des TAG en sortie de carence nutritionnelle. ....	185
6	Discussion et conclusion du Chapitre 3.....	190
6.1	Pureté des LD purifiées. ....	191
6.2	Connection des LD aux organites et au métabolisme .....	191
6.3	La protéine StLDP majoritaire des LD est fortement diminuée chez les mutants Seipin	192
6.4	Remobilisation de lipides en sortie de carence nutritionnelle.....	193
	<b>Proposition d'un modèle de fonctionnement de PtSeipin et discussion générale.....</b>	<b>196</b>
1	Implication de la Seipin dans un modèle d'accumulation des TAGs chez les diatomées .....	199
1.1	Hypothèse d'une synthèse de TAG accrue par la voie de Kennedy. ....	200
1.2	Augmentation de l'activité des GPAT.....	200
2	Hypothèse du recyclage des glycérolipides.....	201
2.1	Recyclage des glycérolipides par une PDAT .....	201
3	Hypothèse d'un recyclage des TAG affecté.....	201
3.1	La StLDP est impliquée dans l'hydrolyse des TAG et n'est plus recrutée à la LD.....	202
3.2	Liaison de la LD à la mitochondrie.....	202
3.3	Dégradation des TAG dans la mitochondrie.....	203
4	Conclusion .....	204
	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>206</b>
1	Organismes modèles et conditions de cultures cellulaires.....	206
1.1	La diatomée <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	206
1.2	Méthodes générales de cultures.....	206
1.3	Récolte cellulaire .....	208
1.4	Cryo préservation .....	208
2	Culture et transformation des levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	208
2.1	Souche BY4741 .....	208
2.2	Cultures en milieu liquide.....	209
2.3	Culture en milieu solide.....	209
2.4	Récolte cellulaire .....	210

2.5	Cryo préservation .....	210
3	Biologie moléculaire .....	210
3.1	Réaction de polymérisation en chaine .....	210
3.2	Clonage et constructions de vecteurs d'expression .....	211
3.3	Purification des acides nucléiques amplifiés .....	219
3.4	Techniques de transformations cellulaires .....	220
4	Analyses physiologiques de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	222
4.1	Concentration cellulaire .....	222
5	Méthodes d'études des LDs .....	223
5.1	Marquage chimique par le rouge de Nil et par le MDH .....	223
5.2	Purification des LDs chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	226
6	Méthodes d'analyses des lipides.....	227
6.1	Extraction des lipides à partir des surnageants de culture. ....	227
6.2	Extraction des glycérolipides selon la méthode de Folch .....	228
6.3	Extraction des glycérolipides selon la méthode de Bligh & Dyer.....	228
6.4	Méthanolyse des acides gras .....	228
6.5	Quantification des acides gras totaux et des glycérolipides .....	229
7	Méthodes d'analyses des protéines.....	230
7.1	Extraction de protéines .....	230
7.2	Expression <i>in vitro</i> de PtSeipin .....	232
7.3	Dosage des protéines .....	232
7.4	Immunodétection des protéines.....	234
8	Récapitulatif des lignées de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> Knock-Out Seipin utilisées.....	237
	<b>Annexe .....</b>	<b>239</b>
	<b>Liste de participations à des congrès et communications orales.....</b>	<b>243</b>
	<b>Liste de productions scientifiques : .....</b>	<b>244</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>245</b>



## Table des Figures

Figure 1 : Position des diatomées au sein de la classification du vivant. ....	3
Figure 2 : Diversité morphologique des frustules de diatomées. ....	5
Figure 3 : Diagramme simplifié de l'augmentation de l'oxygène atmosphérique à l'échelle géologique. ....	6
Figure 4 : Représentation schématique de l'endosymbiose primaire aboutissant à l'ancêtre commun des <i>Archaeplastida</i> . ....	7
Figure 5 : Représentation schématique de l'endosymbiose secondaire aboutissant aux Straménopiles (Hétérocontes). ....	8
Figure 6 : Schéma de la réduction de l'endosymbiotes au cours de l'endosymbiose secondaire et de l'établissement des membranes du plaste chez les diatomées. ....	9
Figure 7 : formule semi-développée du glycérol tri-alcool formant le squelette commun aux glycérolipides et montrant la nomenclature <i>sn</i> -. ....	12
Figure 8 : Structure des différents phospholipides retrouvés chez <i>P.tricornutum</i> . ....	13
Figure 9 : Structure des différents galactoglycérolipides retrouvés chez <i>P.tricornutum</i> . ....	14
Figure 10 : structure des différents bêtaines lipides que l'on retrouve chez les diatomées. ....	15
Figure 11 : structure chimique des TAG et des DAG. ....	15
Figure 12 : Schéma simplifié de la phase claire et de la phase sombre de la photosynthèse aboutissant à la formation de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). ....	17
Figure 13 : Synthèse <i>de novo</i> des acides gras. La synthèse et l'élongation des acides gras jusqu'à 16 carbones se déroule dans le plaste chez <i>P.tricornutum</i> . ....	18
Figure 14 : Schéma des voies de désaturation des acides gras et de leur élongation au-delà de 16 carbones. ....	19
Figure 15 : Voies de biosynthèse des glycérolipides plastidiaux. ....	21
Figure 16 : Voies de biosynthèse des lipides extraplastidiaux. ....	23
Figure 17 : Schéma des voies de dégradation des Acyl-CoA par la $\beta$ -oxydation peroxisomale ou mitochondriale chez les diatomées. ....	28
Figure 18 : Observations microscopiques des LD dans des cellules de levure KO Seipin. ....	71
Figure 19 : Observation en microscopie de lignées de levures KO Seipin complétée par différents isoformes. ....	72
Figure 20 : L'oligomère de Seipin forme une structure toroïdale. ....	79
Figure 21 : Schéma de l'orientation topologique des protéines Fld1 et Ldb16 comparé à la protéine Seipin de l'Homme. ....	80

Figure 22 : Représentation structurale du domaine luméral de la Seipin.....	81
Figure 23 : Les domaines transmembranaires de Seipin (Fld1) chez la levure <i>S.cerevisiae</i> forment une cage et adoptent deux conformations différentes .....	82
Figure 24 : Modèle moléculaire du passage entre la conformation A et la conformation B et implication dans le bourgeonnement de la LD .....	83
Figure 25 : Co localisation de Seipin et LDAF1 dans des cellules SUM159. ....	85
Figure 26 : Modèle d'interaction entre la Seipin et LDAF1 dans le bourgeonnement de la gouttelette lipidique chez l'Homme.....	85
Figure 27 : Modèle d'interaction entre la Seipin, LDIP et LDAP dans le bourgeonnement de la gouttelette lipidique chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	86
Figure 28 : Prédiction de domaines transmembranaire pour la Seipin de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> associés à un domaine central non cytoplasmique. ....	91
Figure 29 : Prédiction de structure de PtSeipin par AlphaFold. ....	92
Figure 30 : Prédiction topologique de l'insertion de PtSeipin dans une membrane biologique. ....	93
Figure 31 : Prédiction de l'hydrophobicité des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ dans la partie lumérale de PtSeipin..	94
Figure 32 : La protéine Seipin de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> révèle des boucles supplémentaires par rapport à la Seipin d' <i>Homo Sapiens</i> .....	95
Figure 33 : L'alignement de séquence de la Seipin entre plusieurs organismes révèle des parties relativement conservées et des parties non conservées.....	97
Figure 34 : Position des 5 premiers motifs (logo) identifiés sur la structure de PtSeipin. ....	99
Figure 35 : Phylogénie des protéines Seipin .....	101
Figure 36 : Prédiction d'homo oligomérisation de deux monomères par la partie lumérale de la protéine Seipin de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> à travers des liaisons hydrogènes.....	103
Figure 37 : Observation de multimères de PtSeipin après migration sur gel de polyacrylamide.....	104
Figure 38 : Représentation schématique du scénario évolutif de la Seipin chez les Chromalvéolé ( <i>P.tricornutum</i> ) .....	107
Figure 39 : Aspect des LD chez les mutants levures Seipin (lignées <i>Ylr404w</i> ) comparé aux lignées sauvage dans nos expériences .....	110
Figure 40 : Expression de protéines Seipin hétérologues chez la lignée <i>Ylr404w</i> de <i>S.cerevisiae</i> .....	111
Figure 41 : Croissance des lignées de levures KO pour la Seipin ( <i>Ylr404w</i> ) complémentées par différents isoformes de Seipin .....	112
Figure 42 : observations microscopiques de lignées de levures KO pour la Seipin ( <i>Ylr404w</i> ) complémentées par différents isoformes de Seipin .....	113
Figure 43 : Nombre et taille des LD dans les lignées de levures KO pour la Seipin ( <i>Ylr404w</i> ) complémentées par différents isoformes de Seipin. ....	114

Figure 44 : profils d'acides gras totaux des levures KO pour la Seipin ( <i>Ylr404w</i> ) complé­mentées par différents isoformes de Seipin .....	114
Figure 45 : Profils de glycérolipides dans les lignées de levure KO Seipin et complé­mentées par différents isoformes de Seipin .....	115
Figure 46 : Quantité et composition de Triacylglycérols (TAGs) dans les lignées de levure KO Seipin et exprimant différents isoformes de Seipin.....	116
Figure 47 : Quantité et composition de phosphatidylcholine (PC) dans les lignées de levure KO Seipin et exprimant différents isoformes de Seipin.....	117
Figure 48 : Quantité et composition de phosphatidylethanolamine (PE) dans les lignées de levure KO Seipin et exprimant différents isoformes de Seipin.....	118
Figure 49 : Observation en microscopie optique de la localisation <i>in vivo</i> de PtSeipin chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . .....	120
Figure 50 : Morphologie cellulaire des KO et surex­presseurs de <i>PtSeipin</i> . Mesures de la longueur (A) et de la largeur .....	123
Figure 51 : Croissance des différentes lignées au cours d'une cinétique de culture de 8 jours.....	124
Figure 52 : Mesure de l'intensité de fluorescence du rouge de Nil dans les cellules à plusieurs jours de la cinétique de culture en condition de culture normale.....	125
Figure 53 : Profils morphologiques des gouttelettes lipidiques en condition de culture normale. Gauche : jour 4 de culture cellulaire ; droite : jour 8 de culture cellulaire. ....	127
Figure 54 : Estimation de la taille des LD dans les mutants Seipin et répartition selon leur diamètre en condition de culture normale.....	128
Figure 55 : Croissance des différentes lignées au cours d'une cinétique de culture de 8 jours sous forte lumière. ....	130
Figure 56 : Mesure de l'intensité de fluorescence du rouge de Nil dans les cellules à plusieurs jours de la cinétique de culture en condition de forte lumière .....	130
Figure 57 : Profils morphologiques des gouttelettes lipidiques en condition de forte lumière. Gauche : jour 4 de culture cellulaire ; droite : jour 8 de culture cellulaire. ....	132
Figure 58 : Estimation de la taille des LD dans les mutants Seipin et répartition selon leur diamètre en condition de culture normale.....	133
Figure 59 : Observations en microscopie électronique de cellules sauvages et de cellules mutantes cultivées pendant 7 jours sous forte lumière.....	135
Figure 60 : Profils d'acides gras des lignées sauvage, KO Seipin et surex­presseurs à 4 jours de culture cellulaire.....	138
Figure 61 : Quantités totales de glycérolipides par millions de cellules récoltées après 4 jours de culture .....	139

Figure 62 : Profils des glycérolipides après 4 jours de culture cellulaire en condition normales et en condition de forte lumière. ....	140
Figure 63 : Quantités totales de glycérolipides par millions de cellules récoltées après 8 jours de culture. ....	141
Figure 64 : Profils des glycérolipides après 8 jours de culture cellulaire en condition normales et en condition de forte lumière .....	142
Figure 65 : Profil des triacylglycerols (TAG) dans les différentes lignées.....	143
Figure 66 : Profil de la phosphatidylcholine (PC) dans les différentes lignées.....	144
Figure 67 : Profil de la phosphatidylethanolamine (PE) dans les différentes lignées.....	145
Figure 68 : Profil du DGTA dans les différentes lignées. ....	146
Figure 69 : Profils des classes de glycérolipides après 4 ou 8 jours de carence en phosphate. ....	148
Figure 70 : Observation des structures intracellulaires des cellules cultivées en conditions de carence en phosphate.....	149
Figure 71 : Observation de gouttelettes lipidiques extracellulaires chez les mutants KO Seipin cultivées dans différentes conditions et observés à différents jours de culture.....	150
Figure 72 : Observation de l'expulsion d'une gouttelette lipidique hors d'une cellule chez un mutant KO Seipin.. ....	151
Figure 73 : Quantité de TAG présents dans les surnageants par millilitre (mL) de culture. ....	152
Figure 74 : Observations en microscopie électronique de cellules en division et répartition de LD dans une population d'algues.....	154
Figure 75 : proposition d'un modèle micro-fluidique pour l'extraction d'huile à partir de mutants <i>PtSeipin</i> KO.....	157
Figure 76 : Résumé graphique de la méthodologie employée pour la purification et l'étude des LD. ....	160
Figure 77 : Photographies des LD purifiées au sommet du gradient sucrose après ultracentrifugation.. ....	161
Figure 78 : Profils des glycérolipides totaux dans les LD purifiées.....	162
Figure 79 : Profils des MGDG dans les cellules entières ou dans les LD en condition de carence en azote.....	163
Figure 80 : Coloration au nitrate d'argent des protéines précipitées à partir des LD purifiées et après migration sur gel dénaturant (SDS-Page).....	164
Figure 81 : Immunodétection par Western Blot des fractions purifiées de LD.....	165
Figure 82 : Immunodétection par Western Blot de la StLDP dans les fractions cellulaires de protéine totales.....	166

Figure 83 : Diagramme de Venn comparant le nombre total de protéines détectées précédemment (Lupette <i>et al.</i> , 2018) avec notre étude .....	167
Figure 84 : Abondance relative des protéines identifiées dans la condition de forte lumière par rapport à la condition de carence en azote dans la lignée sauvage et dans la lignée $\Delta seipin1.3$ .....	169
Figure 85 : Abondance relative des protéines identifiées chez le mutant $\Delta seipin1.3$ par rapport à la lignée sauvage en condition de forte lumière et de carence en azote .....	172
Figure 86 : Volcano plot montrant les fonctions protéiques enrichies ou diminuées chez le mutant $\Delta seipin1.3$ par rapport à la lignée sauvage en condition de carence en azote.....	178
Figure 87 : Volcano plot montrant les fonctions protéiques enrichies ou diminuées chez le mutant $\Delta seipin1.3$ en condition de forte lumière.....	180
Figure 88 : Les mutants Seipin ne parviennent pas à remobiliser efficacement les LD dans les jours qui suivent la sortie de la carence nutritionnelle.....	185
Figure 89 : Analyses des classes lipidiques en sortie de carence nutritionnelle chez la lignée sauvage et $\Delta seipin1.3$ .....	187
Figure 90 : profils des espèces composant les TAG dans les lignées en sortie de carence nutritionnelle.....	188
Figure 91 : profils des espèces composant la PC dans les lignées en sortie de carence nutritionnelle ou bien en carence prolongée.....	189
Figure 92 : profils des espèces composant le DGTA dans les lignées en sortie de carence nutritionnelle ou bien en carence prolongée.....	190
Figure 93 : Modèle d'interaction de Seipin chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	198
Figure 94 : Principe du clonage Gibson par recombinaison isothermale in vitro en une seule étape. ....	212
Figure 95 : Carte du plasmide pIVEX2.3d. ....	213
Figure 96 : carte du plasmide pIVEX-Seipin construit. ....	214
Figure 97 : carte du vecteur d'expression pPHA-T1_eGFP_SeipinGFP construit par clonage Gibson.. ....	216
Figure 98 : Cartes des plasmides obtenus pour l'expression de différentes Seipin chez la levure <i>S.cerevisiae</i> . ....	219

## Table des Tableaux

Tableau 1 : Diversité des principaux acides gras présents chez <i>P. tricornutum</i> . .....	20
Tableau 2 : Liste des motifs identifiés dans les 48 séquences de Seipin par le logiciel en ligne MEME et significativement présents chez <i>PtSeipin</i> . .....	98
Tableau 3 : Paires d'acides aminés pouvant être impliqués dans l'établissement de liaisons hydrogène entre deux monomères adjacents de Seipin chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . .....	104
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des protéines dont l'abondance est significativement enrichie ou diminuée chez le mutant par rapport à la lignée sauvage dans les conditions de forte lumière ou bien de carence en azote. ....	174
Tableau 5 : Tableau récapitulatif du nombre de protéines associées à différentes fonctions dans les LD purifiées. ....	181
Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour l'assemblage par clonage Gibson et le séquençage du vecteur d'expression pIVEX-Seipin. ....	213
Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour l'assemblage par clonage Gibson du vecteur d'expression pPHA-T1_eGFP_SeipinGFP .....	215
Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour séquençage du vecteur pPHA-T1_eGFP_SeipinGFP.....	216
Tableau 9 : Liste des amorces utilisée pour l'amplification des différentes parties nécessaires à la construction des vecteurs d'expression des Seipin chez la levure. ....	217
Tableau 10 : Liste des amorces utilisées pour amplification de la séquence génomique codant la Seipin et des amorces utilisées pour séquençage Sanger. ....	222
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des volumes de protéines soumis aux analyses protéomiques estimés par coloration au nitrate d'argent. ....	233
Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés dans les différentes expérimentations conduite dans cette thèse. ....	236
Tableau 13 : Tableau récapitulatif des différentes lignées KO Seipin utilisées dans les expérimentations. ....	237

## Liste des Abréviations

ADN	Acide desoxyribonucléique
AGPAT2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2
ALA	acide linoléique
AOX	acyl-CoA oxidase
ARA	acide arachidonique
ARN	Acide ribonucléique
ASQD	l'acyl-sulfoquinovosyldiacylglycérol
ATGL	Autophagie Related
ATP	Adénosine Tri Phosphate
ATS1	glycérol-3-phosphate acyltransférase 1
ATS2	1-acylglycérol-3-phosphateacyltransférase
BSA	Albumine de sérum bovin
BSCL2	Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2
CATs	carnitine acyltransferases
CDIP	CDP-DAG inositol 3-phosphatidyltransferase
CMC	Concentration Micellaire Critique
DAG	Diacylglycérol
DGAT	acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferases
DGCC	1,2-diacylglycéryl-3-Ocarboxy-(hydroxyméthyl)-choline
DGDG	digalactosyldiacylglycérol
DGTA	diacylglycéryl-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)- $\beta$ -alanine
DHA	acide docosahexaénoïque
DPA	acide docosapentaénoïque
EHY	enoyl-CoA hydratase
EPA	acide eicosapentaénoïque
EpM	Membrane Epi-plastidiale
EPT	ethanolaminophosphotransferase
ERAD	voie de dégradation associée au ER
FA	Acide gras
FAME	esters méthyliques d'acides gras
FAS	Acide gras synthase
FAT	Acyl-ACP thioesterase
G3P	glycérol-3-Phosphate
GC-FID	chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
GFP	Protéine fluorescente verte
GPAT	glycérol-3-phosphate acyltransférase 1
iEM	Membrane interne de l'enveloppe du plaste
KAT	3-ketoacyl-CoA thiolase
KO	Knock Out
LACS	long chain acyl-CoA synthetase
LC	chromatographie en phase liquide
LD	gouttelette lipidique
LDACs	LD Assembly protein Complexes
Ido1	Lipid Droplet Organisation

LPA	acide lyso-phosphatidique
LPAAT	1-acylglycérol-3-phosphateacyltransférase
LPCAT	lyso-phosphatidylcholine acyltransferase
Lyso-PC	Lyso phosphatidylcholine
MGDG	monogalactosyldiacylglycérol
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OE	Surexprimeur
oEM	Membrane externe de l'enveloppe du plaste
PA	acide phosphatidique
PAD	palmitoyl-ACP desaturase
PAP	phosphatidic acid phosphatase
PC	phosphatidylcholine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAT	phospholipid:diacylglycérol acyltransférase
PDCT	PC:DAG cholinephosphotransferase
PDH	pyruvate deshydrogénase
PE	phosphatidylethanolamine
PG	phosphatidylglycérol
PGP	phosphatidylglycerophosphatase
PI	phosphatidylinositol
PLA2	phospholipaseA2
PPAR $\gamma$	récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes
PPM	Peri-Plastidiale Membrane
PSD	phosphatidylserine decarboxylase
PSS	phosphatidylserine synthase
RNAi	Interference par l'ARN
SDP1	Sugar Dependant 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
SQD2	Sulfoquinovosyl transferase 2
SQDG	sulfoquinovosyldiacylglycérol
TAG	Triacylglycérol
TGL	Triglyceride Lipase
VLC-PUFA	Acides gras à très longues chaînes poly insaturées





## **Partie Introduction**



## Les diatomées

Depuis la révolution industrielle au XIX<sup>ème</sup> siècle, les activités de l'Homme ont causé un réchauffement climatique planétaire à travers les émissions de gaz à effet de serre. Le climat se réchauffe à un rythme effréné et sans précédent : +0,85°C en moyenne à la surface du globe en 2016 et +1,1°C en 2023 par rapport à la période préindustrielle. Quels que soient les scénarios, un réchauffement de 1,5°C global ne pourra être évité au début 2030 (Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2022). Les coûts matériels et humains engendrés par le nombre croissant de catastrophes naturelles qui en résultent (inondations, intempéries, incendies, sécheresse...) sont conséquents : 5,5 millions de personnes touchées par les inondations entre 1980 et 2011, pertes économiques liées de plus de 90 milliards d'euros (Commission Européenne sur le Climat, 2016). Entre 2010 et 2020, la mortalité due aux catastrophes naturelles a été 15 fois supérieure dans les pays très vulnérables. Les experts estiment que les conséquences seraient encore pires si le réchauffement dépassait 1,5°C par rapport aux années préindustrielles ; une telle augmentation entraînerait la perte de 4% des vertébrés, 6% des insectes, 8% des plantes et entre 70 et 90% des récifs coralliens (IPCC, 2018). La lutte contre le réchauffement climatique doit entre autres, limiter les actions de l'Homme pour permettre aux forêts de régénérer et de recycler le CO<sub>2</sub> : avec l'augmentation de la température, les mécanismes naturels d'absorption du carbone seront de moins en moins efficaces (IPCC, 2023). Toutefois, un autre acteur majeur de ce processus de régénération est trop souvent sous-estimé : l'océan et son écosystème qui sont pourtant au cœur de notre équilibre climatique.

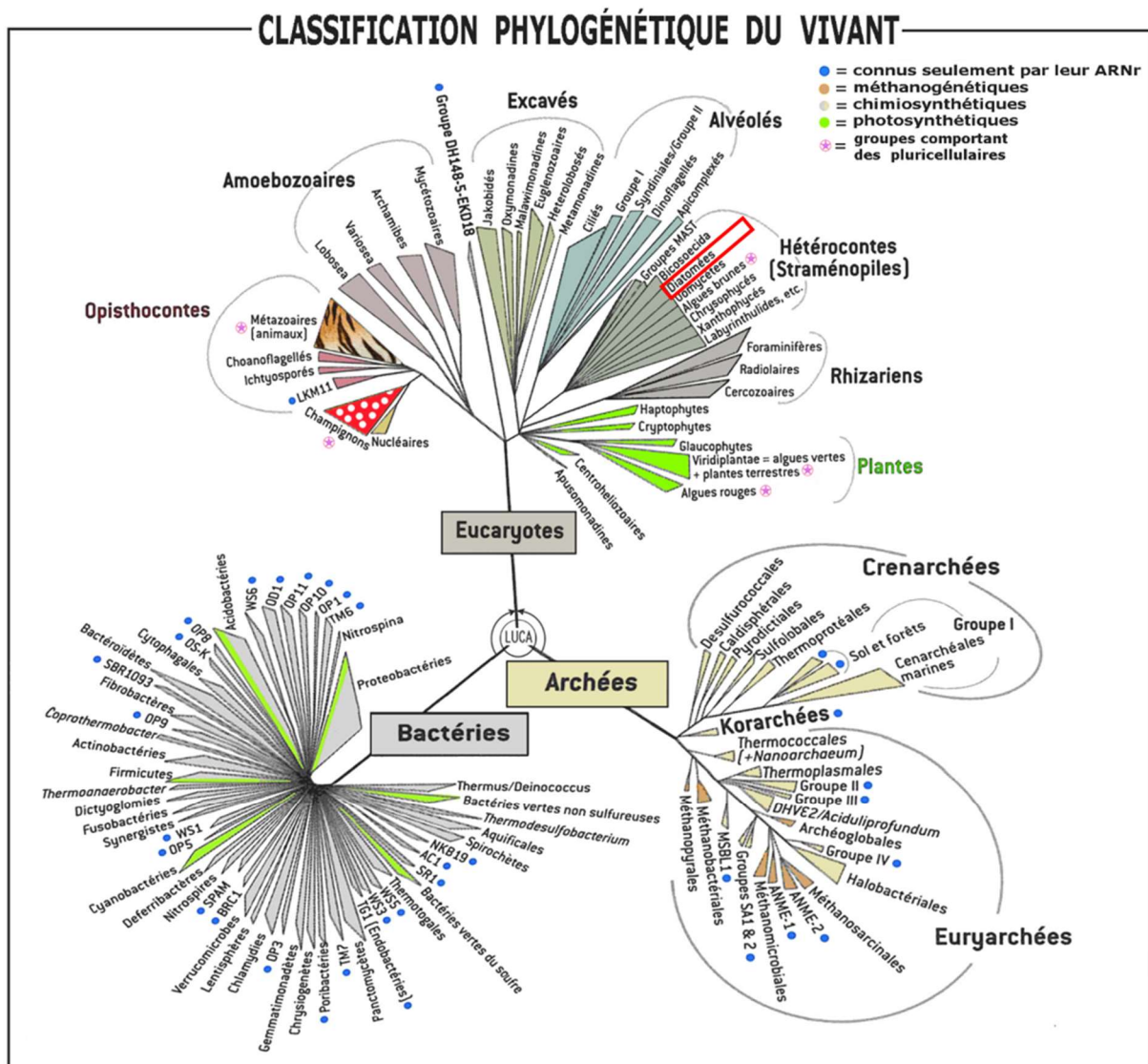
1 Les diatomées sont une classe majeure dans la diversité du phytoplancton.

Les communautés microbiennes marines sont extrêmement diversifiées et sont constituées de groupes interconnectés de cyanobactéries, de bactéries hétérotrophes, d'archées, de virus, de phytoplancton eucaryotes et de protistes non photosynthétiques. Le groupe de phytoplanctons le plus abondant dans les océans sont les cyanobactéries marines tandis que le groupe le plus divers sont les diatomées avec un nombre d'espèces maximum estimé proche de 200 000 (Armbrust, 2009).

### 1.1 *Classification des diatomées*

On regroupe généralement sous le terme microalgues l'ensemble des organismes unicellulaires photosynthétiques, représentés par une extrême diversité à travers l'arbre du vivant. Malgré leur capacité commune à réaliser la photosynthèse, les microalgues présentent des différences majeures de par leurs architectures cellulaires et leurs fonctions métaboliques extrêmement variées en fonction du règne ou du phylum auquel elles appartiennent. Par exemple, les Cyanobactéries appartiennent au règne bactérien, tandis que les Haptophytes ou les Diatomées sont des eucaryotes

(Figure 1). Nous nous intéresserons dans cette partie uniquement aux microalgues eucaryotes, et plus particulièrement aux diatomées auxquelles appartient l'organisme modèle *Phaeodactylum tricornutum* utilisé dans ces travaux.



**Figure 1 : Position des diatomées au sein de la classification du vivant.** Les trois règnes du vivant sont représentés. L'embranchement des diatomées, au sein du phylum des *Hétérocontes*, est encadré en rouge. Source : ('Arbre phylogénétique', Wikipedia 2023)

Les diatomées (ou *Bacillariophyta*) représentent un embranchement eucaryote appartenant au Phylum des *Hétérocontes* (*Straménopiles*), qui sont rassemblés dans le supergroupe des SAR (*Straménopiles*, *Alvéolés*, *Rhizariens*) (Figure 1). Les plus anciens fossiles de diatomées ont été datés d'environ 180 millions d'années, pendant la période jurassique (Falkowski, Barber and Smetacek, 1998) tandis que les estimations d'horloge moléculaire estiment leur apparition à 200 millions d'années, proche de l'extinction Trias-Jurassique (Nakov, Beaulieu and Alverson, 2018; Bryłka et al., 2023).

Aux rangs taxonomiques inférieurs, les diatomées ont été séparées en deux groupes : les diatomées centriques et les diatomées pennées.

- Dans l'ordre des diatomées dites centrales ou centriques (ordre des *Biddulphiales*), les cellules présentent une symétrie radiale. L'organisme modèle étudié en laboratoire est *Thalassiosira pseudonana*. Son génome est entièrement séquencé (Armbrust *et al.*, 2004). Les diatomées centriques sont sous-divisées en deux classes, les centriques polaires (*Mediophyceae*) et les centriques radiales (*Coscinodiscophyceae*)
- L'ordre des diatomées pennales ou pennées (Ordre des *Bacillariales*) présente une symétrie bilatérale et les représentants sont divisés en pennées raphides (*Bacillariophyceae*) et araphides (*Fragilariophyceae*). L'organisme modèle *P.tricornutum* dont le génome est également séquencé (Bowler *et al.*, 2008) appartient aux *Bacillariophyceae*.

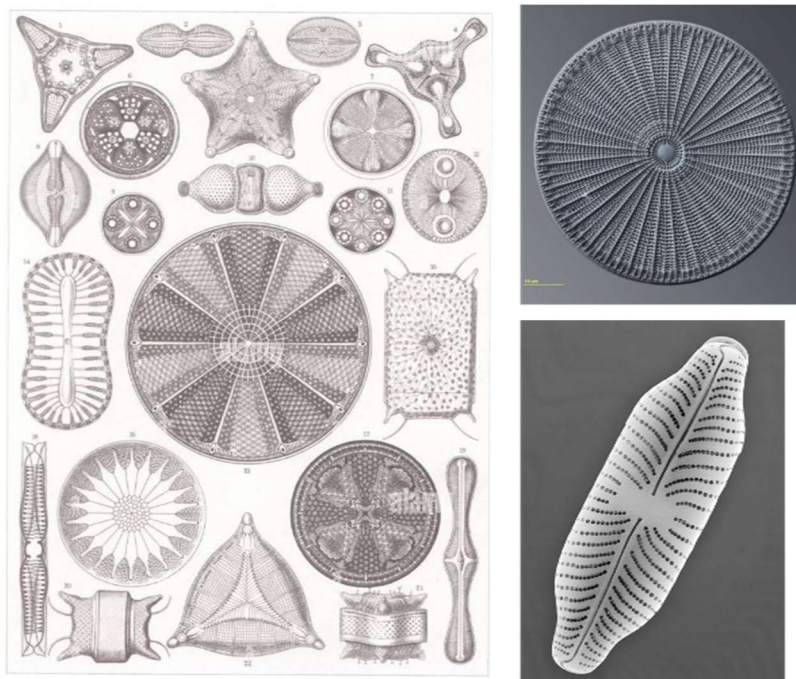
On estime la divergence entre les diatomées centriques et pennées à 90 millions d'années. Seulement 57% des gènes de *P.tricornutum* sont partagés par homologie de séquence avec *T.pseudonana* (Bowler *et al.*, 2008) ce qui montre qu'au sein du même ordre, les espèces ont fortement divergé. Le taux d'évolution est déterminé par la vitesse de changement génétique sur une période donnée. À titre d'exemple, on notera un taux d'évolution similaire entre les deux diatomées *P.tricornutum/T.pseudonana*, entre les levures *Saccharomyces cerevisiae/Kluyveromyces lactis* et quasiment autant qu'entre l'Homme et le poisson globe (Bowler *et al.*, 2008). Cela illustre parfaitement la divergence importante et le taux d'évolution très rapide entre les deux groupes de diatomées en 200 millions d'années lorsque l'on rappelle que les mammifères et les poissons ont divergé probablement autour des 550 millions d'années.

## 2 Rôle des diatomées dans l'environnement

Les diatomées sont très largement représentées dans tous les milieux aquatiques à travers le monde, en eaux douces ou salées, et peuvent coloniser les milieux suffisamment pourvus en lumière et en nutriments. Elles tendent à dominer les communautés de phytoplancton lorsque les milieux sont enrichis ce qui leur permet de rapidement se multiplier. Ce phénomène qualifié de « bloom » survient lorsque les conditions optimales sont réunies (lumière, azote, phosphate, silice, fer, éléments trace métal...) et est dû au fait que les diatomées prolifèrent plus rapidement que les autres espèces de phytoplancton. En situation inverse de carence nutritionnelle, la colonie décroît très rapidement et le nombre d'individus peut chuter drastiquement. Les individus sont capables de contrôler leur flottabilité le long de la colonne d'eau afin d'atteindre un équilibre entre quantité suffisante de lumière reçue et accès aux nutriments (Armbrust, 2009).

Bien que les diatomées ne représentent que 1% de la biomasse photosynthétique terrestre totale, elles sont responsables d'environ 45% de la régénération d'oxygène et représentent 40% de la production primaire nette dans les océans, à la base de la chaîne alimentaire (Field *et al.*, 1998). Leur efficacité photosynthétique repose sur le fait que chaque cellule soit photo-synthétiquement active (Benoiston *et al.*, 2017), contrairement aux plantes dont seuls certains tissus aériens, la plupart du temps la face interne des feuilles appelée mésophylle foliaire, effectuent la photosynthèse.

En plus de leur rôle essentiel dans le cycle du carbone, une autre compétence des diatomées est leur capacité à précipiter la Silice soluble en nanostructures extrêmement élaborées. Ce métabolisme unique est d'une importance majeure pour le cycle biogéochimique de cet élément dans les océans (Tréguer *et al.*, 1995). Cette nanostructure offre une protection aux diatomées et forme une coque solide mais transparente appelée frustule, laissant passer la lumière essentielle pour la photosynthèse. Cette structure, dont la formation est contrôlée génétiquement, permet à des facteurs externes, comme la salinité, d'avoir une influence sur la densité ou la taille des pores de la silice ainsi précipitée. Les pores permettent de maintenir des échanges entre la cellule et l'environnement. De nombreuses espèces de diatomées élaborent cette coque dont la forme, la morphologie originale et remarquable ont fasciné les naturalistes depuis le début du 20ème siècle



**Figure 2 : Diversité morphologique des frustules de diatomées.** A gauche, lithographie d'après le biologiste allemand Ernst Haeckel, « Formes artistiques de la Nature », 1899. A droite : images de microscopies d'une diatomée centrique (haut, *Arachnoidiscus oamaruensis*) et d'une diatomée pennée (bas, *Navicula sp.*).

(Figure 2)(Haeckel, 1899) et continue d'émerveiller de nos jours.

La frustule est également associée à une matrice organique riche en sucres et en protéines qui empêche la Silice de se dissoudre dans le sel de mer. La découverte de ces processus de bio minéralisation s'opérant à basse température a ouvert aux chimistes le domaine de la « chimie douce » et des applications industrielles multiples (optique, nanosciences, médecine...) (Jacques Livage - Académie des sciences, 2017).

On notera la coïncidence spatiale entre les dépôts de Silice et les réserves d'énergies fossiles, ce qui suggère le rôle crucial qu'ont joué les diatomées dans la formation des réserves actuelles (Benoiston *et al.*, 2017).

3 Les diatomées sont issues d'une histoire évolutive complexe.

L'histoire évolutive et l'apparition des diatomées est complexe et distincte de celle des plantes ou d'autres espèces photosynthétiques. Lorsque l'on se place à des échelles géologiques, la production d'oxygène à partir d'eau combinée à la réduction du dioxyde de carbone atmosphérique par la photosynthèse était assurée par des cyanobactéries ancestrales et a eu un impact majeur sur la composition de l'atmosphère terrestre telle que nous la connaissons aujourd'hui. Une transition dans la composition de l'atmosphère terrestre a eu lieu il y a environ 2,4 milliards d'années au cours d'un évènement majeur appelé la Grande Oxygénation. La quantité d'oxygène libérée dans l'atmosphère a rapidement augmenté avant de se stabiliser il y a 2 milliards d'années pendant une longue période d'un milliard d'années (Figure 3).

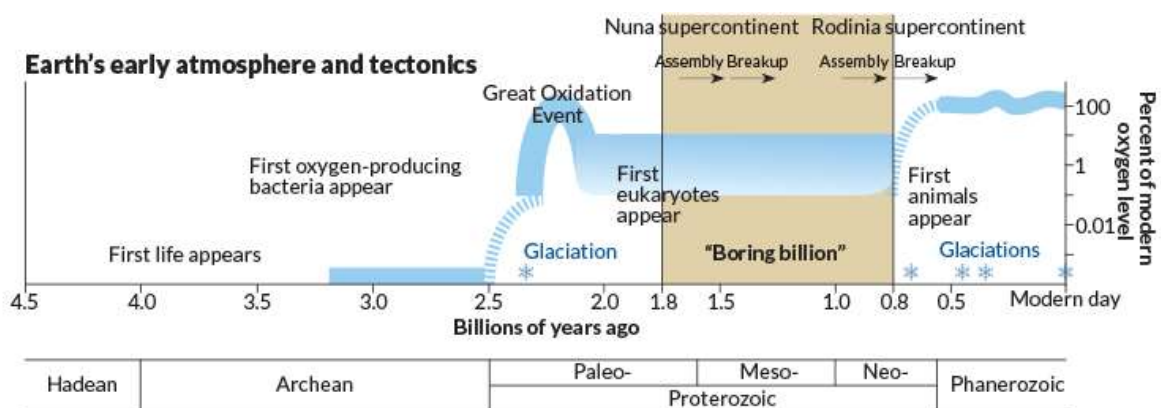


Figure 3 : Diagramme simplifié de l'augmentation de l'oxygène atmosphérique à l'échelle géologique. Le bond en avant représente la Grande Oxygénation. Image de J.Hirschfeld via Wikimedia Commons.

Les cyanobactéries représentaient une proportion majoritaire de la biodiversité aux côtés d'archées et de virus jusqu'à l'apparition des premières cellules eucaryotes il y a 1,8 milliard d'années,

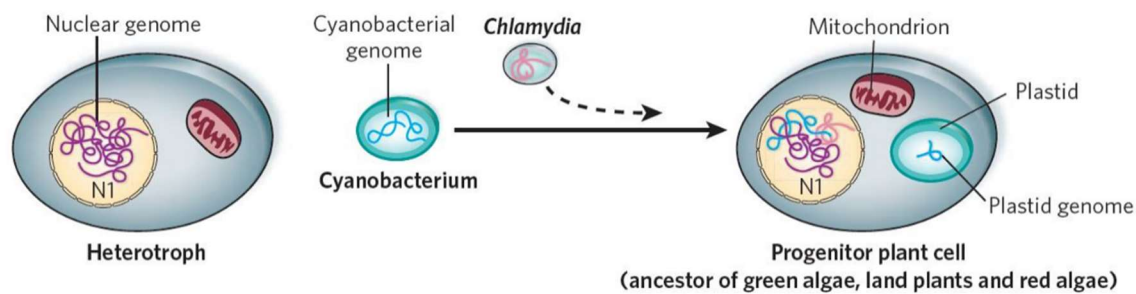


rapidement suivie (-1,5 milliard d'années) d'un évènement évolutif majeur : l'endosymbiose primaire.

### 3.1 Les diatomées sont des endosymbiotes secondaires

#### 3.1.1 Endosymbiose primaire

La première endosymbiose consiste en l'incorporation d'une cyanobactérie par une cellule eucaryote hétérotrophe (**Figure 4**) (Yoon *et al.*, 2004). Cet évènement a permis l'émergence de l'ancêtre commun des *Archaeplastida* (ou *Plantae*), un supergroupe phylogénétique comprenant les algues vertes, les plantes terrestres, les rhodophytes (algues rouges) et les glaucophytes.



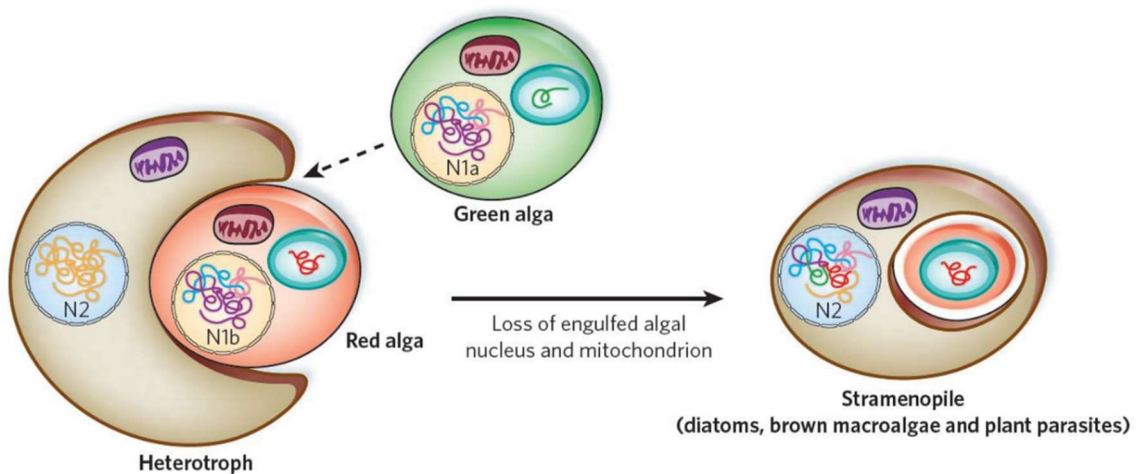
**Figure 4 : Représentation schématique de l'endosymbiose primaire aboutissant à l'ancêtre commun des *Archaeplastida*.** Incorporation d'une cyanobactérie par un hétérotrophe eucaryote ancestral. Une contamination simultanée potentielle par une bactérie du genre *Chlamydia* est indiquée en pointillé. Cet évènement aboutit aux cellules ancestrales des algues vertes, plantes terrestres et algues rouges actuelles. D'après Armbrust, 2009.

L'équipement photosynthétique est ainsi fourni par la cyanobactérie et son intégration sous forme d'un plaste apporte des avantages considérables, outre la capacité évidente de réaliser la photosynthèse. Elle apporte ainsi un compartiment cellulaire exclusif qui permet d'assurer des fonctions clés du métabolisme telles que la synthèse d'acides gras (*cf.* Métabolisme lipidique chez les diatomées, partie 2), d'isoprénoïdes, ou d'acides aminés (Reyes-Prieto *et al.*, 2006; Armbrust, 2009). En outre, une certaine quantité de matériel génétique est transférée depuis la cyanobactérie dans le génome de l'hôte, apportant une diversité génétique et par extension une diversité métabolique importante. Ce transfert de matériel semble s'être opéré dans des proportions différentes entre les différentes lignées composant le groupe des *Plantae* (Reyes-Prieto *et al.*, 2006).

La présence de gènes issus de bactéries du genre *Chlamydia* chez les plantes et les algues rouges actuelles mais pas chez les cyanobactéries permettent de supposer l'incorporation simultanée par une bactérie pendant l'endosymbiose primaire. Il a été proposé que cet évènement a probablement joué un rôle dans le maintien du plaste chez l'hôte (Huang and Gogarten, 2007). La nature de ces évènements et l'hypothèse d'une endosymbiose supplémentaire sont encore discutées.

### 3.1.2 Endosymbiose secondaire

À l'issue de l'endosymbiose primaire émergent les algues vertes, les algues rouges et les glaucophytes. Environ 500 millions d'années plus tard, plusieurs endosymbioses secondaires vont avoir lieu et impliquent l'incorporation d'une cellule photosynthétique par un deuxième eucaryote hétérotrophe (Cavalier-Smith, 2003; Reyes-Prieto *et al.*, 2006). L'endosymbiose d'une algue verte donnera alors les groupes des Euglenozoaires (ex : *Euglene*) et des Chlorarachniophytes (ex : *Bigelowiella*) tandis que l'endosymbiose d'une algue rouge aboutit aux lignées des Haptophytes (ex : *Nannochloropsis*), des Straménopiles (Hétérocontes) (ex : *Phaeodactylum*) ou des Apicomplexes (ex : *Plasmodium*).



**Figure 5 : Représentation schématique de l'endosymbiose secondaire aboutissant aux Straménopiles (Hétérocontes).** Engloutissement d'une algue rouge par un deuxième eucaryote hétérotrophe. La perte du noyau et des organites de l'algue rouge couplée au maintien de son plaste donne le groupe des stramenopiles. La présence d'un nombre important de gènes issus de la lignée verte dans le génome des stramenopiles suppose l'implication d'une algue verte dont le rôle et la nature précis ne sont pas parfaitement établis (représenté par une flèche en pointillé). D'après Armbrust, 2009.

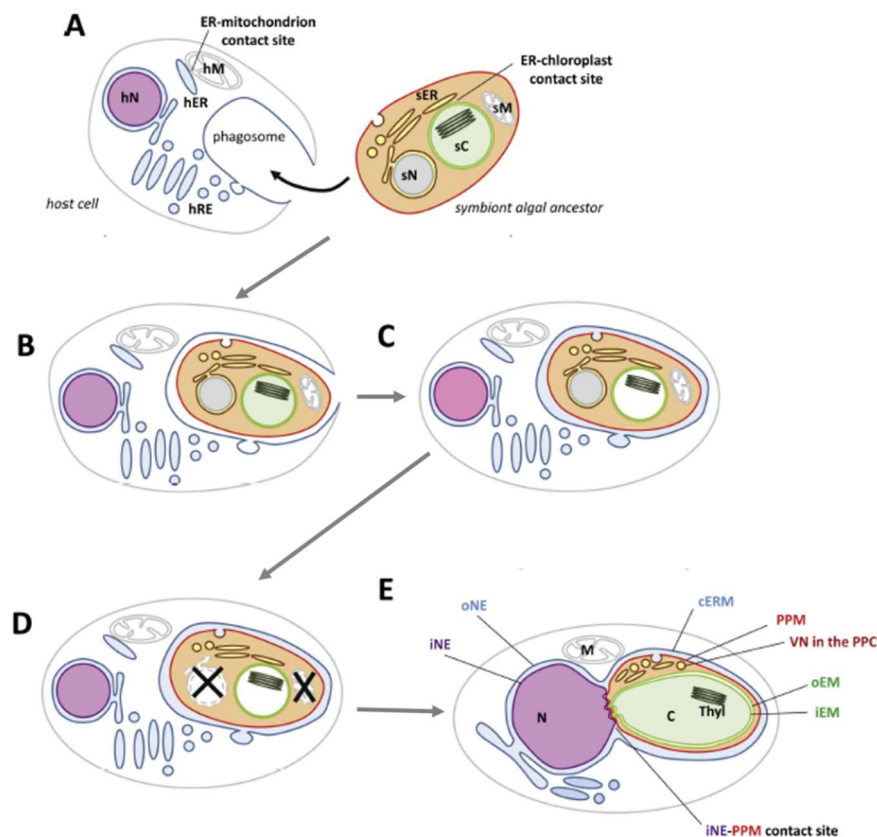
Cependant, un nombre important de gènes issus de la lignée verte ont été rapportés dans le génome des Straménopiles (1700 gènes comptant pour 16% du protéome des diatomées) (Moustafa *et al.*, 2009). Ce matériel génétique est présent dans le génome nucléaire des diatomées et il est évolutivement proposé qu'une endosymbiose impliquant une algue verte ait précédé celle de l'algue rouge. Seul le plaste de cette dernière aurait été maintenu et celui de l'algue verte aurait été éliminé. Plusieurs gènes d'origines « vertes » auraient néanmoins été conservés (**Figure 5**). La nature même et l'affiliation de l'algue verte dans ce scénario n'est cependant pas encore clairement établie (Moustafa *et al.*, 2009).

La réduction des structures subcellulaires du symbiote a également lieu pour ne conserver majoritairement que le plaste secondaire (Cavalier-Smith, 2003). Certaines structures appelées

nucléomorphes sont observées entre les membranes du plaste et sont considérées comme des reliquats de l'algue rouge endosymbiotique (Curtis *et al.*, 2012). Ces structures ne sont pas présentes chez les diatomées.

### 3.2 Les endosymbioses sont à l'origine d'un plaste complexe

Une conséquence liée aux deux événements d'endosymbioses successives est la présence d'un plaste dit complexe c'est-à-dire entouré par minimum deux et maximum quatre membranes, comme c'est le cas chez les diatomées dont *Phaeodactylum tricornutum*.



**Figure 6 : Schéma de la réduction de l'endosymbiote au cours de l'endosymbiose secondaire et de l'établissement des membranes du plaste chez les diatomées.** D'après Flori *et al.*, 2016. (A) : cellule eucaryote hôte et algue rouge symbiotique. (B) : absorption de l'algue rouge par la cellule eucaryote. (C) : internalisation de l'algue rouge et maintien de la membrane de phagocytose autour de l'endosymbiote. (D) : perte progressive des organites de l'endosymbiote (noyau, mitochondries, structures cytosoliques). (E) : statut actuel montrant la continuité entre la membrane la plus externe du plaste (cERM aussi appelée EpM) et la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (oNE) probablement à la suite de leur fusion. C, chloroplast; N, Noyau ; M, Mitochondrie ; Thyl, Thylakoïde ; cERM, chloroplast endoplasmic reticulum membrane ; iEM, inner envelope membrane; iNE, inner nuclear envelope ; oEM, outer envelopemembrane ; oNE, outer nuclear envelope ; PPC, periplastidial compartment ; PPM, periplastidial membrane; Thyl, thylakoid, VN, vesicular network.

L'hypothèse la plus probable et la plus communément admise concernant l'origine précise des membranes enveloppant les plastes chez les diatomées est représentée **Figure 6** (Flori *et al.*, 2016) : les deux enveloppes les plus internes du plaste (« outer » et « inner » enveloppe membrane, oEM et

iEM, **Figure 6**) proviennent certainement de l'enveloppe du chloroplaste de l'algue ancestrale endosymbiotique, elle-même issue de la cyanobactérie ancestrale de l'endosymbiose primaire. La troisième membrane appelée PPM (« periplastidial membrane ») dérive probablement de la membrane plasmique de l'algue rouge endosymbiotique (Grosche *et al.*, 2014). Enfin, la membrane la plus externe (« epiplastidial membrane » EpM aussi appelée « chloroplast endoplasmic reticulum membrane » cERM - **Figure 6**) est continue avec la membrane la plus externe de l'enveloppe nucléaire (Murakami and Hashimoto, 2009; Flori *et al.*, 2016). Elle pourrait avoir dérivé de la membrane de phagocytose de l'hôte avant de fusionner avec le système endomembranaire.

Dans cette architecture particulière, le transport de lipides entre le RE et le plaste et l'adressage des protéines au plaste doit se faire à travers plusieurs membranes et a nécessité la mise en place de caractéristiques évolutives majeures et uniques chez les endosymbiotes secondaires. Pour les protéines, des séquences d'adressages particulières sont traduites dans un premier temps du côté N-terminal et sont appelées pré-séquences bipartites. La première partie contient une séquence d'adressage au plaste tandis que la deuxième partie contient une séquence de transit permettant l'adressage au stroma du plaste. Un motif commun au site de clivage du peptide transit (motif peptidique ASAFAP, désigné comme tel de manière éponyme) a été identifié comme spécifique des protéines adressées au plaste (Chaal and Green, 2005; Kilian and Kroth, 2005). Le transport de lipides à travers ces membranes est encore mal connu et sujet à des investigations, notamment au sein de notre laboratoire.

Il est très difficile expérimentalement de purifier correctement les plastes de diatomées et d'en séparer les membranes qui les composent. Pour cette raison, leurs compositions précises en lipides ne sont pas encore connues mais des hypothèses basées sur leurs origines évolutives peuvent être établies. Etant donné la forte conservation de composition et d'architecture entre des membranes de chloroplastes dits primaires (présents dans des organismes issus d'une endosymbiose primaire uniquement, par exemple plantes et algues vertes, **Figure 4**) et des membranes de cyanobactéries (Boudière *et al.*, 2014; Petroutsos *et al.*, 2014), il est fort probable qu'il en soit de même chez les diatomées. On peut donc supposer que les membranes oEM et iEM les plus interne (**Figure 6**) soient composées majoritairement de galactoglycérolipides MGDG et DGDG. Les lipides composant les membranes plus externes (PPM, EpM) sont certainement plus proches en composition de ceux du système réticulaire c'est-à-dire riches en phospholipides et en bêtaines lipides (Boudière *et al.*, 2014; Dolch and Maréchal, 2015).

#### 4 Succès écologique des diatomées

Les différents évènements d'endosymbiose qui ont conduit à l'émergence des diatomées ont été à l'origine de combinaisons de gènes qui ont largement contribué au succès écologique de ces organismes (Armbrust, 2009). De plus, environ 7,5% des gènes de *P. tricornutum* semblent avoir été acquis par transfert horizontal de gènes bactériens (Bowler *et al.*, 2008), ce qui laisse supposer que de tels événements sont répandus chez les diatomées avec une fréquence plus importante que pour les autres eucaryotes ce qui peut contribuer à une grande diversité génétique. Leur génome a également évolué très rapidement, probablement grâce à la présence d'éléments transposables permettant d'entretenir une dynamique évolutive importante (Maumus *et al.*, 2009). La nature chimérique du génome de *P. tricornutum* montre une combinaison originale de gènes donnant accès à des voies métaboliques d'assimilation de nutriments et de gestion de métabolites peu communes chez les algues, résultant de la fusion remarquable entre des caractéristiques animales et de plantes. On y retrouve, par exemple, un cycle de l'urée complet, généralement associé aux organismes hétérotrophes (animaux), qui intervient dans le métabolisme de l'azote et permet aux diatomées de gérer des situations de carence (Armbrust *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2011), bien que son utilisation effective par la microalgue soit encore sujette à de nombreuses recherches (Allen, Vardi and Bowler, 2006). Les diatomées ont également la capacité de générer de l'énergie à partir du catabolisme des lipides via la  $\beta$ -oxydation mitochondriale comme chez les animaux ou peroxisomale comme chez les plantes (*cf.* Métabolisme lipidique chez les diatomées, partie 5). Ce couplage semble physiologiquement lié à la capacité de survivre à des périodes d'obscurité prolongées et de faciliter la transition lors du retour à la lumière comme c'est le cas pour des diatomées polaires.

Il a également été montré que les interactions entre les organites « énergétiques » de la cellule (plastides et mitochondries) permettent d'optimiser le couplage et le rendement énergétique de la cellule (Bailleul *et al.*, 2015). Le maintien de la balance ATP/NADPH, essentiel pour la conversion du CO<sub>2</sub> en matière organique grâce à la photosynthèse est régulée activement par des échanges entre le plaste et la mitochondrie (Bailleul *et al.*, 2015). La corrélation entre les volumes de plaste et de mitochondrie a été étudiée par des reconstructions 3D et des analyses volumétriques. Ces ratios sont très conservés entre plusieurs espèces de microalgues ce qui est également une des raisons majeures de la performance des diatomées en terme de métabolisme énergétique (Uwizeye *et al.*, 2021).

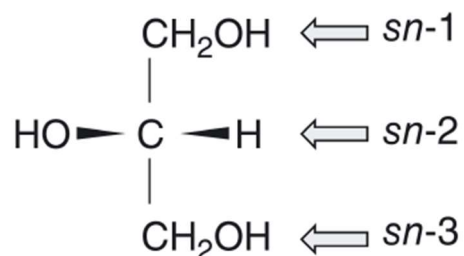
## Métabolisme lipidique chez les diatomées.

Les microalgues et les diatomées sont de plus en plus envisagées comme des organismes d'intérêts industriels majeurs grâce à la quantité et à la diversité de lipides qu'elles sont capables de produire (cf. Applications industrielles des microalgues, p30). Néanmoins, leur métabolisme est relativement peu connu par rapport à celui des animaux, des plantes ou bien des algues vertes (Abida *et al.*, 2015), ce qui reste encore très limitant pour exploiter tout leur potentiel d'un point de vue biotechnologique. Une grande partie des modèles de voies de synthèse des lipides chez les diatomées dérivent principalement de la comparaison de leur génome avec ce qui est connu chez les plantes et les algues vertes (Zulu *et al.*, 2018) mais de nombreux aspects sont encore mal connus. L'ensemble des travaux menés, dont ceux portant sur le métabolisme des lipides permettent progressivement de mieux comprendre ces organismes si particuliers. Dans cette partie, nous décrirons principalement les différentes classes de glycérolipides présentes chez les diatomées, les voies métaboliques connues pour les synthétiser ainsi que les acides gras qui les composent.

### 1 Les différentes classes de glycérolipides chez les diatomées

#### 1.1 Structure commune des glycérolipides

Les glycérolipides sont les principaux constituants des membranes cellulaires et représentent un groupe de lipides aux rôles et aux structures variés. Leur base commune comporte un squelette glycérol à 3 carbones dont les positions sont nommées par nomenclature *sn-1*, *sn-2* et *sn-3* (**Figure 7**). Sur chacune de ces positions, une à trois chaînes d'acides gras (FA, « fatty acid ») peuvent être estérifiées. Un FA est une longue chaîne hydrocarbonée présentant un groupe carboxyl terminal, dont la nomenclature indique le nombre de carbone et le nombre d'insaturations entre deux liaisons carbone (cf. Métabolisme lipidique chez les diatomées, parties 2.2 et 2.3). Ainsi, un FA 20:5 possède 20 atomes de carbone et 5 insaturations. Chez *Phaeodactylum tricornutum* les longueurs de chaînes de FA comportent un nombre pair de carbone compris entre 14 et 20 ; les FA majoritaires ont 16 et 20 carbones (16:0, 16:1, 16:3 et 20:5) (Abida *et al.*, 2015).

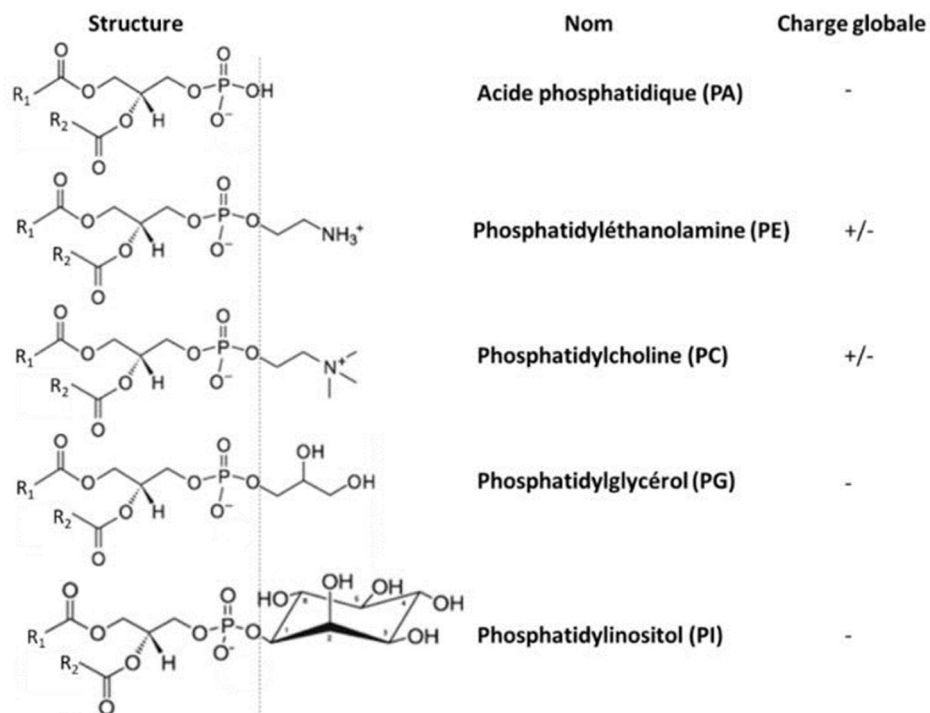


**Figure 7 : Formule semi-développée du glycérol tri-alcool formant le squelette commun aux glycérolipides et spécifiant la nomenclature *sn-*.**

Les glycérolipides sont communément classés selon la nature du groupe présent en position *sn*-3 du squelette glycérol. On trouve ainsi des groupements phosphates (phospholipides), des sucres (galactoglycérolipides), des groupements bétaïnes (bétaïnes lipides) ou bien un troisième acide gras (triacylglycérols).

### 1.2 Les phospholipides

Les phospholipides possèdent un groupement phosphate qui porte une charge négative, en position *sn*-3 du squelette glycérol. On peut relever 5 classes de phospholipides majoritaires chez *P.tricornutum* : l'acide phosphatidique (PA), le phosphatidylglycérol (PG), le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE). Dans les organismes photosynthétiques, ils composent en grande partie les membranes extra-plastidiales, bien que de la PC, du PG et du PI soient retrouvés dans les membranes chloroplastiques de plantes (Douce, Holtz and Benson, 1973; Block *et al.*, 2007).

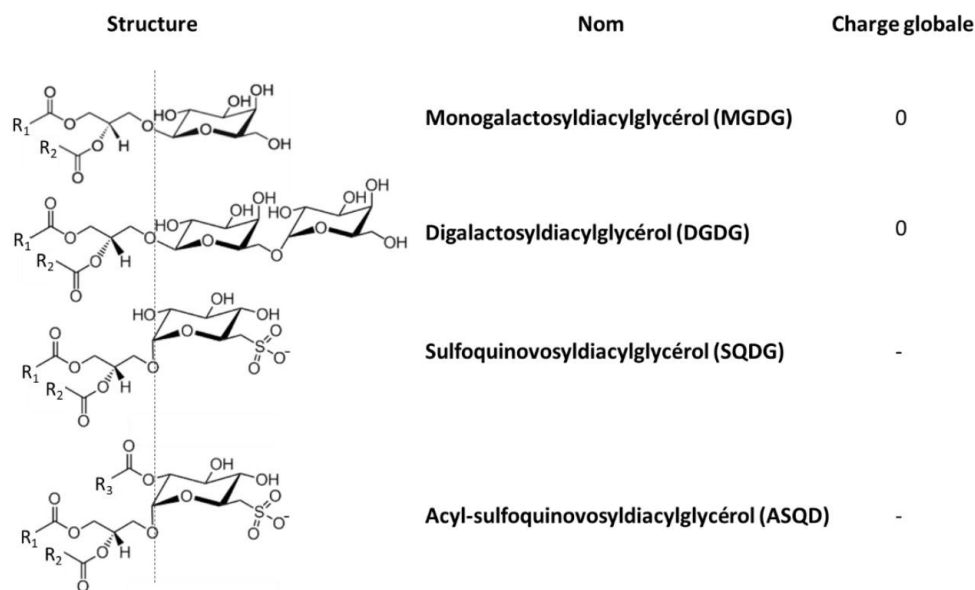


**Figure 8 : Structure des différents phospholipides retrouvés chez *P.tricornutum*.** La charge globale du lipide est notée (-) pour une charge négative et +/- pour une charge apparente neutre (Zwitterion). R1 et R2 correspondent aux chaînes de FA estérifiées en positions *sn*-1 et *sn*-2. D'après (Bolik, 2022)

### 1.3 Les glycolipides

Les glycolipides possèdent au moins un sucre en position *sn*-3 du squelette glycérol et correspondent aux lipides principaux composant les membranes photosynthétiques. On classe ces lipides en galactolipides avec le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) qui possèdent respectivement un et deux galactoses. La deuxième catégorie correspond aux

sulfolipides avec le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et l'acyl-sulfoquinovosyldiacylglycérol (ASQD), ce dernier étant très minoritaire chez *P.tricornutum* (Abida *et al.*, 2015; Bolik, 2022).



**Figure 9 : Structure des différents galactoglycérolipides retrouvés chez *P.tricornutum*.** La charge globale du lipide est notée (-) pour une charge négative et 0 pour une absence de charge. R1 et R2 correspondent aux chaînes de FA estérifiées en positions *sn-1* et *sn-2*. D'après (Bolik, 2022)

#### 1.4 Bétaïnes lipides

Les bétaïnes lipides sont spécifiques des algues (dont les lichens) et de certaines plantes comme les mousses et les fougères. Ils sont absents des plantes à graines (angiospermes et gymnospermes). Le bétaïne lipide présent chez *P.tricornutum* est le diacylglycéryl-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)- $\beta$ -alanine (DGTA) tandis que chez *T.pseudonana* on retrouve du 1,2-diacylglycéryl-3-Ocarboxy-(hydroxyméthyl)-choline (DGCC). Chez les plantes et algues vertes, on retrouve du 1,2-diacylglycéryl-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homosérine (DGTS).

La structure de la tête polaire des bétaïnes lipides est très similaire à celle des têtes polaires des phospholipides (**Figure 10**), et en particulier de la PC. Ils peuvent s'organiser en bicouche (Bolik 2022) et lors de carence en phosphate, alors que les phospholipides sont recyclés, il est rapporté que les quantités de bétaïnes lipides augmentent de manière compensatoire et remplacent probablement la PC (Moore, Du and Chen, 2001; Abida *et al.*, 2015). Bien que leur localisation ne soit pas encore démontrée, il est fort probable qu'ils soient présents dans les membranes non plastidiales (voir Bolik, 2022).

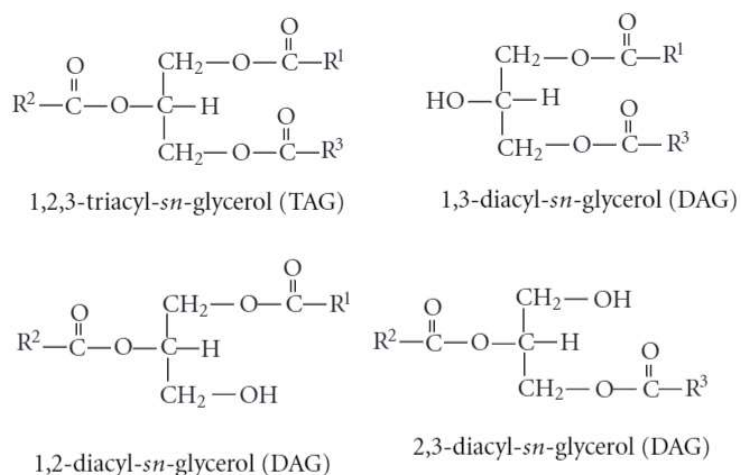


Structure	Nom	Charge globale
	1,2-diacylglycéryl-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homosérine (DGTS)	+/-
	1,2-diacylglycéryl-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)-β-alanine (DGTA)	+/-
	1,2-diacylglycéryl-3-O-carboxy-(hydroxyméthyl)-choline (DGCC)	+/-

**Figure 10 : Structure des différents bêtaïnes lipides que l'on retrouve chez les diatomées.** Seul le DGTA est présent chez *P.tricornutum*. La charge globale du lipide est notée +/- pour une charge apparente neutre (zwitterion). On notera la forte similarité de la tête polaire avec celle de la PC. R1 et R2 représentent les chaînes d'acides gras estérifiées en positions *sn*-1 et *sn*-2 du squelette glycérol. D'après (Bolik, 2022).

### 1.5 Les lipides non polaires

A l'inverse des phospholipides, les diacylglycérols (DAG) et les triacylglycérols (TAG) ne présentent pas de charges électriques. Ils sont produits respectivement par estérification de 2 ou 3 FA sur le squelette glycérol. De ce fait, plusieurs stéréochimies sont possibles pour les DAG selon la combinaison de positions estérifiées (**Figure 11**) (Madawala *et al.*, 2011).



**Figure 11 : Structure chimique des TAG et des DAG.** R1, R2 et R3 représentent les chaînes d'acides gras estérifiées respectivement en *sn*-1, *sn*-2 et *sn*-3 du squelette glycérol. D'après (Madawala *et al.*, 2011).

Les DAG sont les intermédiaires dans la formation des autres lipides précédemment décrits. Ils s'accumulent de manière transitoire dans les membranes et semblent jouer un rôle sur la morphologie de celle-ci, en induisant des courbures négatives (Eichmann and Lass, 2015).

Les TAG (communément appelés « huile ») sont des molécules chimiquement inertes, très hydrophobes et possédant une forte densité énergétique. Les TAG ne sont physico-chimiquement pas capables de s'assembler par cohésion latérale à l'inverse des autres lipides polaires. À faible concentration, ils s'accumulent entre les membranes biologiques et lorsque leur concentration devient trop importante, ils coalescent pour former des lentilles. Des mécanismes cellulaires sont alors mis en place pour les compartimentaliser dans des structures particulières, les gouttelettes lipidiques (LD, « Lipid droplets »). L'organisation, la structure et les fonctions des LD sont présentées dans le chapitre de revue Partie Les Gouttelettes Lipidiques, page 34.

Sous certains stress biotiques et abiotiques, les microalgues peuvent produire des quantités importantes de TAG comme forme de stockage de carbone et d'énergie, ce qui a conduit à qualifier les microalgues d'oléagineuses (Hu *et al.*, 2008; Du and Benning, 2016; Le Moigne, Guéguen and Salvaing, 2022). Les TAG sont les molécules privilégiées pour diverses applications industrielles allant de l'alimentation humaine et animale (Draaisma *et al.*, 2013) aux biocarburants (Gilmour, 2019) grâce à la grande variété d'acides gras qu'ils peuvent porter. La prise alimentaire de VLC-PUFA (*e.g.* C20 :5) conduit à une réduction du risque cardiovasculaire chez l'Homme (Harris, Kris-Etherton and Harris, 2008). En revanche, les TAG chez les microalgues comprennent majoritairement des acides gras à 16 ou 18 carbones (Abida *et al.*, 2015) dont les longueurs de chaînes peuvent être compatibles avec des applications dans le domaine des biocarburants (Hu *et al.*, 2008; Maréchal, 2021) (*cf.* Applications industrielles des microalgues, partie 1.2).

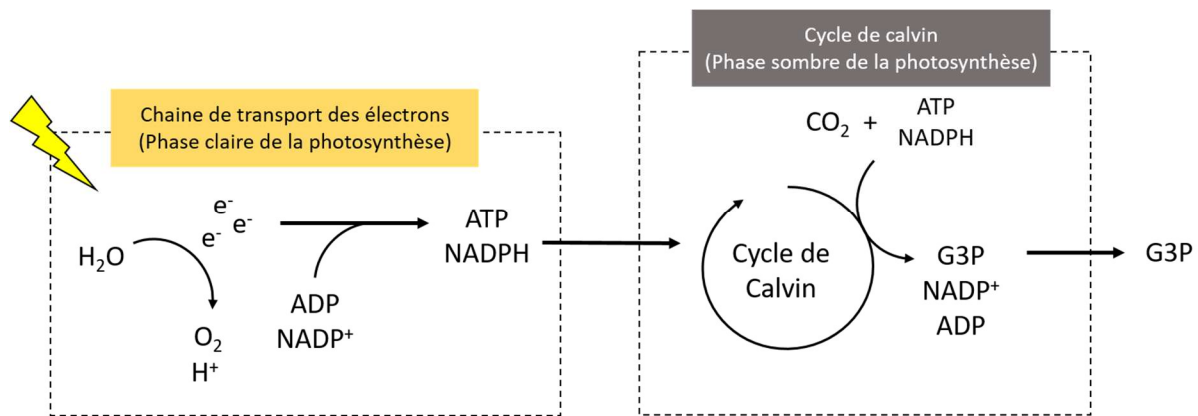
L'accumulation de TAG chez les organismes photosynthétiques et les diatomées suivent un rythme circadien (Chauton *et al.*, 2013). Une partie du carbone et de l'énergie fixés par la photosynthèse sont ainsi stockés sous cette forme ce qui assure des réserves à la cellule. Elle peut récupérer de l'énergie par catabolisme des lipides neutres (*cf.* Métabolisme lipidique chez les diatomées, partie 5) et ainsi assurer diverses fonctions du métabolisme primaire.

## 2 Synthèse des acides gras et des glycérolipides

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le métabolisme des diatomées repose de manière centrale sur la photosynthèse, malgré leur capacité à adopter des régimes mixotrophes (assimilation combinée du carbone par la photosynthèse et par la respiration cellulaire). Le régime mixotrophe présente des intérêts biotechnologiques et industriels avérés (Villanova and Spetea, 2021), en

combinant la production de molécules d'intérêt à du recyclage d'eaux contaminées comme source de carbone par exemple. Ici, nous nous intéresserons majoritairement au régime phototrophe.

## 2.1 Fixation du carbone par la photosynthèse

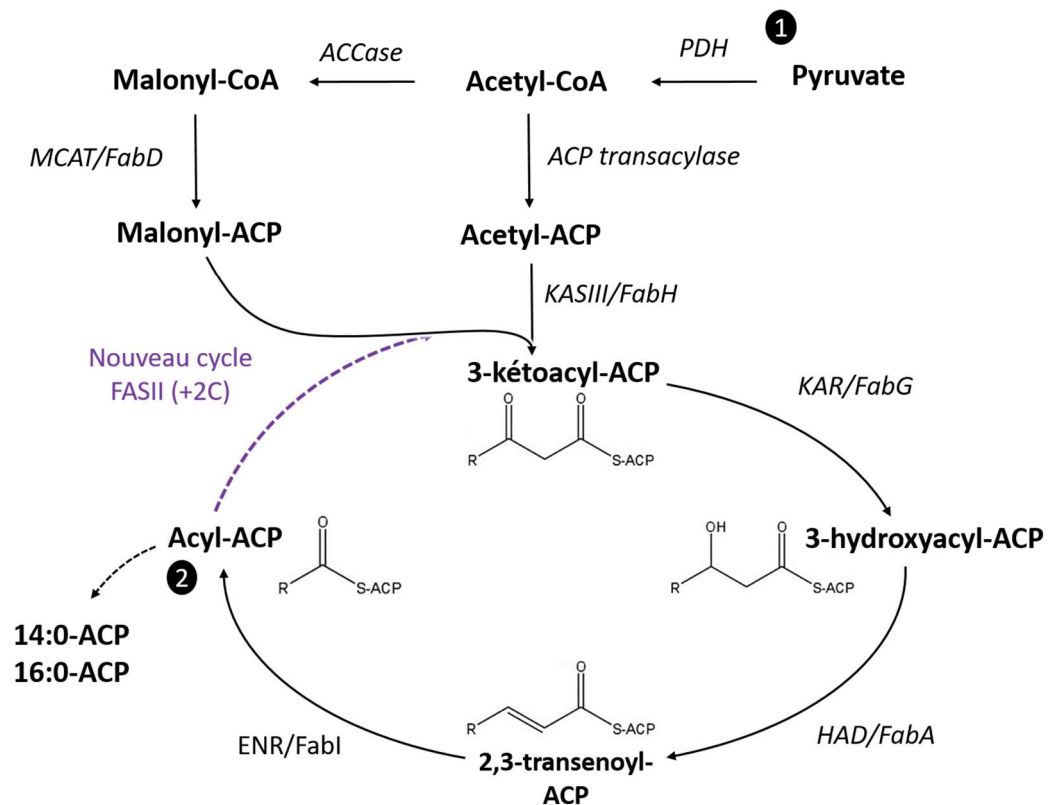


**Figure 12 : Schéma simplifié de la phase claire et de la phase sombre de la photosynthèse aboutissant à la formation de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P).** Modifié d'après (Sciandra, 2022).

Brièvement, la photosynthèse permet de convertir l'énergie lumineuse solaire en une énergie chimique (**Figure 12**). On distingue deux phases. La phase claire de la photosynthèse se déroule dans le stroma des plastes : la réduction de l'eau en oxygène et en ions H<sup>+</sup> génère des électrons qui sont pris en charge par des chaînes de transports situées dans les membranes de thylakoïdes. Cela permet de régénérer de l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) et du pouvoir réducteur NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) à partir d'ADP et de NADP<sup>+</sup>. Cette énergie produite permet de fixer et de réduire le CO<sub>2</sub> au niveau des pyrénoides (structure interne des plastes concentrant des enzymes de la photosynthèse) par le cycle de Calvin pendant la phase sombre de la photosynthèse. En utilisant ainsi le CO<sub>2</sub>, de l'ATP et du NADPH, le cycle de Calvin produit un triose phosphate (glycéraldéhyde-3-phosphate) ultérieurement utilisé pour former du pyruvate. La décarboxylation du pyruvate par l'enzyme pyruvate deshydrogénase (PDH) constitue le pool majoritaire d'acétyl-CoA dans le plaste (Ke *et al.*, 2000) et constitue le point d'entrée pour la synthèse des FA (**Figure 13**).

## 2.2 La synthèse « de novo » d'acide gras débute dans le plaste

La synthèse de FA chez les diatomées se fait par un processus cyclique assuré par un complexe d'enzymes localisées dans le stroma des plastes appelées FA synthase II (FAS II) (Ryall, Harper and Keeling, 2003). Chez les champignons et les vertébrés, c'est une enzyme fonctionnelle unique (FAS I) qui assure la réaction.



**Figure 13 : Synthèse *de novo* des acides gras. La synthèse et l'élongation des acides gras jusqu'à 16 carbones se déroule dans le plaste chez *P.tricornutum*.** (1) : point d'entrée du cycle par la décarboxylation du pyruvate. (2) point de sortie soit d'un acyl ACP à 14 soit à 16 carbones soit début d'un nouveau cycle +2C si longueur de chaîne < 16 carbones. Modifié d'après (Gueguen, 2022).

Afin d'entrer dans le cycle de formation des FA, il est nécessaire de convertir une partie du pool d'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Cette réaction irréversible se fait par carboxylation (ajout d'un groupe R-COOH) grâce à une acétyl-CoA carboxylase (ACCase, **Figure 13**). Un malonyl-CoA et un acétyl CoA sont activés par des ACP transférases (respectivement ACP S-acétyltransférase : MCAT/FabD et ACP transacylase) formant du malonyl-ACP et de l'acetyl-ACP.

L'initiation de l'élongation (+2C) commence alors par la condensation du malonyl-ACP sur un acyl-ACP en cours de synthèse par l'enzyme  $\beta$ -cétoacyl-ACP synthase III (KAS III ou FabH) pour former du 3-kétoacyl-ACP. Le 3-kétoacyl-ACP est ensuite réduit en 3-hydroxyacyl-ACP par la 3-kétoacyl-ACP-réductase (KAR ou FabG). Puis une déshydratation par une hydroxyacyl-ACP déshydratase (HAD ou FabA) produit du 2,3-transenoyl-ACP qui est finalement réduit par une Enoyl-ACP réductase (ENR ou FabI) pour former l'acyl-ACP.

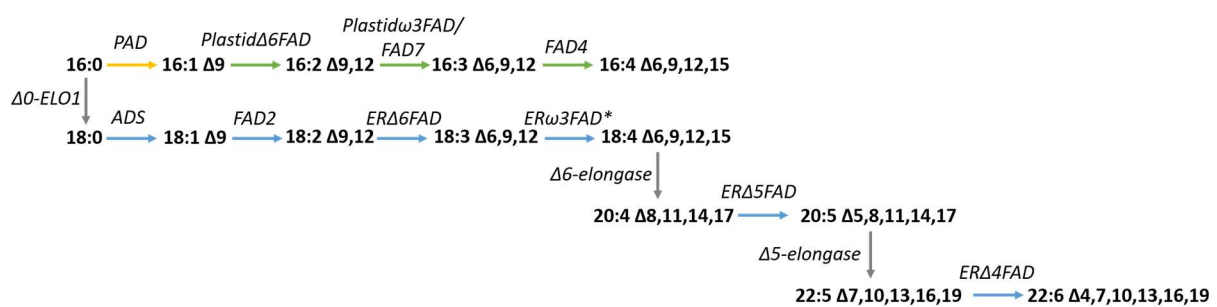
En sortie de cycle, on obtient ainsi un Acyl-ACP (**Figure 13**, 2) qui peut de nouveau entrer dans un nouveau cycle d'élongation si la chaîne est inférieure à 16 carbones (symbolisé par la flèche violette **Figure 13**) ou bien être utilisé pour la synthèse des glycérolipides (Dolch *et al.*, 2017). Deux voies

distinctes interviennent alors : la « voie procaryote » et la « voie eucaryote », qualifiées ainsi par analogie avec les plantes.

- Dans la « voie eucaryote » les Acyl-ACP nouvellement synthétisés dans le plaste sont utilisés directement dans le même compartiment pour la synthèse de glycérolipides.
- Dans la « voie procaryote », les Acyl-ACP sont convertis en acides gras libres par une Acyl-ACP thioesterase (FAT) avant d’être transportés en dehors du plaste jusqu’au réticulum endoplasmique par des mécanismes encore inconnus et sujets à de nombreuses investigations. Les acides gras à 16 carbones exportés au réticulum endoplasmique peuvent subir des séries d’élancements/désaturations supplémentaires jusqu’à former des VLC-PUFA (très longues chaînes poly insaturées comme le 20:5 par exemple) avant de retourner au plaste par des mécanismes encore inconnus.

### 2.3 Désaturation des acides gras et élancements extra-plastidiales

Les deux voies intra et extra plastidiales sont représentées **Figure 14**. A partir de l’acyl ACP à 16 carbone (acide palmitique) la voie de désaturation plastidiale peut faire intervenir au total quatre désaturases pour aboutir à un acide gras 16:4. La première désaturation a lieu sur l’acide palmitique lié à l’acyl-ACP et est réalisée par l’enzyme palmitoyl-ACP desaturase (PAD) introduisant une désaturation en position  $\Delta 9$  sur un acide gras en position *sn1* ou *sn-2*. En revanche, les désaturations ultérieures sont réalisées par des désaturases membranaires agissant directement sur les glycérolipides dans les membranes plastidiales. Successivement, la Plastid $\Delta 6$ FAD ajoute une désaturation en position  $\Delta 12$ , la Plastid $\omega 3$ FAD/FAD7 ajoute une désaturation en position  $\Delta 6$  et enfin la FAD4 en position  $\Delta 15$  (pour revue voir (Dolch and Maréchal, 2015)).

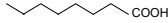
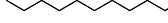

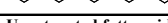
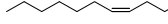


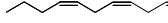



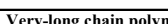





**Figure 14 : Schéma des voies de désaturation des acides gras et de leur élancement au-delà de 16 carbones.** Les désaturations qui ont lieu directement sur des glycérolipides membranaires plastidiaux sont représentés en vert. La première désaturation de la voie procaryote a lieu sur un acyl-ACP et est représentée par une flèche jaune. Les désaturations qui ont lieu dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique sont représentées en bleu (voie eucaryote). Les flèches grises indiquent des élancements. D’après (Gueguen, 2022).

En parallèle, les acides gras exportés hors du plaste (libérés de l’acyl-ACP par la FAT) peuvent alterner entre élancement jusqu’à 22 carbones et désaturations chez *P.tricornutum*, aboutissant à la formation

de VLC-PUFA. Une première élongation est effectuée sur l'acide palmitique par une élongase cytosolique ( $\Delta 0$ -ELO1) donnant de l'acide stéarique (C18:0) puis une première désaturation est effectuée par une désaturase (ADS) donnant du 18:1 $\Delta 9$ . De manière similaire aux désaturations plastidiales, cette première désaturation n'est pas effectuée sur un acide gras lié à un glycérolipide mais sur un acide gras lié à un CoA. Les enzymes réalisant les désaturations suivantes sont localisées ou prédites au ER et permettent des désaturations d'acides gras directement sur les glycérolipides, principalement sur des phospholipides (Dolch and Maréchal, 2015; Conte *et al.*, 2018). La deuxième désaturation est introduite sur le carbone 12 par une FAD2. La suite de la voie de synthèse n'est pas encore totalement caractérisée mais suit probablement le scénario suivant (Gueguen, 2022) : deux désaturations successives sur les carbones 6 et 15 par une ER $\Delta 6$ FAD (caractérisée) et une ER $\omega 3$ FAD (non caractérisée) aboutissent à une chaîne d'acide stéaridonique (C18:4) qui est ensuite utilisée comme précurseur pour l'élongation jusqu'à l'acide arachidonique (C20:4) par une  $\Delta 6$ -élongase. Une désaturation supplémentaire est introduite sur le carbone 5 par une ER $\Delta 5$ FAD donnant l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5) majoritaire sur de nombreux glycérolipides de *P.tricornutum* (Abida *et al.*, 2015). Enfin, une dernière élongation/désaturation permet d'obtenir éventuellement de l'acide docosapentaénoïque (DPA, 22:5) ou de l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6), très minoritaires chez *P.tricornutum*.

**Tableau 1 : Diversité des principaux acides gras présents chez *P.tricornutum*.**

	Systematic name		Trivial name	Abbreviat ion
<b>Saturated fatty acids</b>				
	octanoic	8:0	caprylic	8:0
	tetradecanoic	14:0	myristic	14:0
	hexadecanoic	16:0	palmitic	16:0
	octadecanoic	18:0	stearic	18:0
<b>Unsaturated fatty acids</b>				
	<i>cis</i> -9-hexadecenoic	16:1 <sup>A9</sup>	palmitoleic	16:1 $\omega$ 7
	<i>trans</i> -3-hexadecenoic	16:1 <sup>A31</sup>	palmitoleic trans-isomer* (in chloroplast phosphatidylglycerol)	16:1t
	<i>all-cis</i> -9,12-hexadecadienoic	16:2 <sup>A9,12</sup>		16:2
	<i>all-cis</i> -6,9,12-hexadecatrienoic	16:3 <sup>A6,9,12</sup>		16:3
	<i>cis</i> -9-octadecenoic	18:1 <sup>A9</sup>	oleic	18:1
	<i>all-cis</i> -9,12-octadécadiénoïque	18:2 <sup>A9,12</sup>	linoleic	18:2
	<i>all-cis</i> -6,9,12-octadecatrienoic	18:3 <sup>A6,9,12</sup>	$\gamma$ -linolenic	18:3 $\omega$ 6
	<i>all-cis</i> -9,12,15-octadecatrienoic	18:3 <sup>A9,12,15</sup>	$\alpha$ -linolenic (ALA)	18:3 $\omega$ 3
<b>Very-long chain polyunsaturated fatty acids</b>				
	<i>all-cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoic	20:4 <sup>A5,8,11,14</sup>	arachidonic (ARA)	20:4 $\omega$ 6
	<i>all-cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	20:5 <sup>A5,8,11,14,17</sup>	eicosapentaenoic (EPA)	20:5 $\omega$ 3
	<i>all-cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic	22:6 <sup>A4,7,10,13,16,19</sup>	docosahexaenoic (DHA)	22:6 $\omega$ 3

### 3 Synthèse des glycérolipides

La synthèse des glycérolipides repose sur les précurseurs PA et DAG utilisés comme squelette. Les voies permettant de réimporter des FA depuis le ER jusqu'au plaste pour les incorporer dans des lipides plastidiaux ne sont pas encore connues et les signatures moléculaires présentes sur le DAG

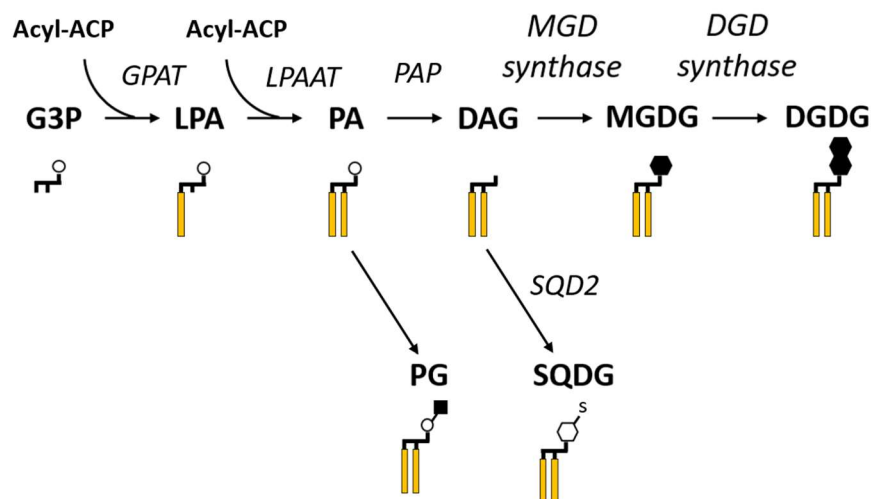
reposent majoritairement sur ce qui est connu dans les organismes comportant un plaste « simple » comme *Arabidopsis thaliana*.

### 3.1 Synthèse des lipides plastidiaux : voie procaryote

La synthèse des glycérolipides des plastes débute par deux estérifications successives de groupement acyl issus d'Acyl-ACP par des acyl transférase (GPAT et LPAAT, homologues des ATS1 et ATS2 d'*Arabidopsis*) sur un glycérol 3 phosphate (G3P) pour former successivement de l'acide lysophosphatidique (LPA) et de l'acide phosphatidique (PA) avant modification de la tête polaire comme présenté **Figure 15**.

La formation du PG à partir du PA se fait en deux étapes. La première étape consiste à fixer une cytidine diphosphate-diacylglycerol (CDP-DAG, formé à partir de PA et de cytidine triphosphate par une CDP-DAG synthase) sur un PA pour produire du PG-phosphate (non représenté sur la **Figure 15**). Puis une phosphatidylglycerophosphatase (PGP) déphosphoryle le PG-phosphate pour former du PG.

Alternativement, le PA peut donner du DAG par l'action d'une enzyme phosphatidate phosphatase (PAP). Le DAG va ainsi servir à former du SQDG par transfert d'un sulfoquinovose depuis un UDP-sulfoquinovose par l'enzyme Sulfoquinovosyl transférase 2 (SQD2). Le DAG permet également de former du MGDG par transfert d'un galactose depuis un UDP-galactose grâce aux MGDG synthases (MGDs). Chez *Phaeodactylum*, trois isoformes de MGDs ont été récemment caractérisées (Gueguen, 2022). Enfin, les DGDG synthases (DGDs : 4 isoformes chez *Phaeodactylum*) utilisent un MGDG comme substrat pour y transférer un autre galactose et former du DGDG.



**Figure 15 : Voies de biosynthèse des glycérolipides plastidiaux.** G3P, glycérol-3-Phosphate ; LPA, acide lyso-phosphatidique ; PA, acide phosphatidique ; DAG, diacylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; PG, phosphatidylglycérol ; GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransférase 1 ; LPAAT, 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase ; PAP, Phosphatidate phosphatase ; SQD2, Sulfoquinovosyl transférase ; MGDsynthase, monogalactosyldiacylglycérol

synthase ; DGDsynthase, digalactosyldiacylglycérol synthase. Les hexagones noirs représentent un galactose, un hexagone blanc représente un sulfoquinovose, les cercles blancs un groupement phosphate. Les rectangles jaunes schématisent les acides gras. Modifié (d'après Lupette, 2018).

### 3.2 Synthèse des lipides extraplastidiaux : voie eucaryote

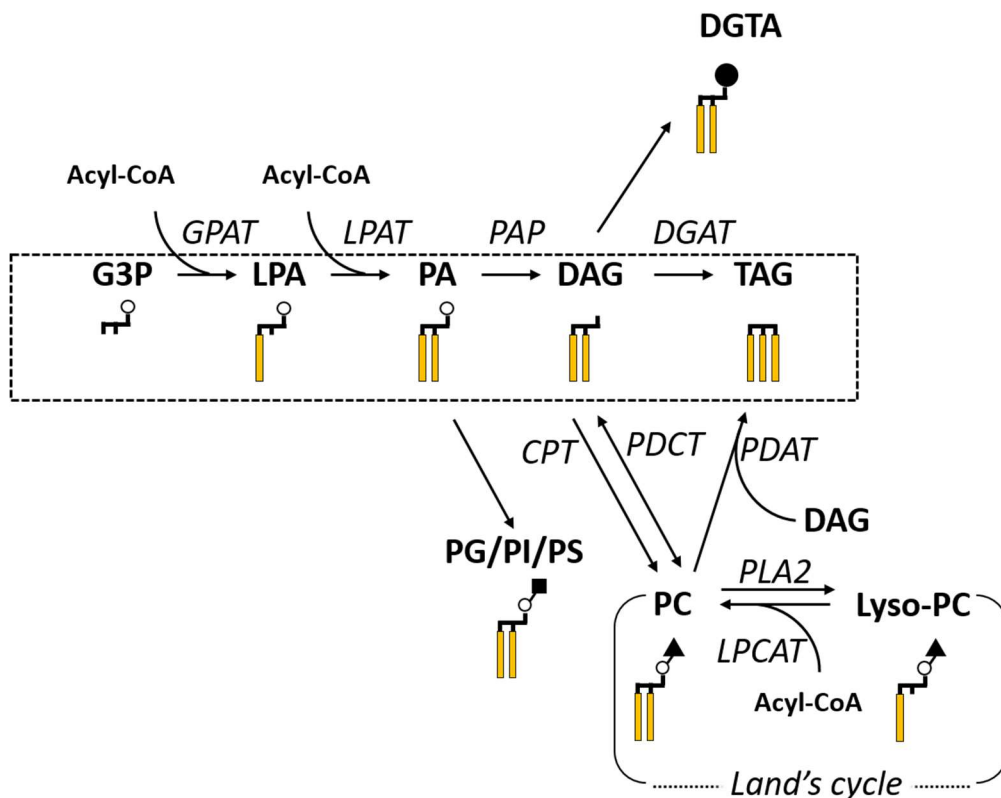
La synthèse des lipides extraplastidiaux suit un schéma similaire mais les chaînes d'acyl utilisées pour les estérifications successives sur le G3P sont liées à un co-enzyme A (Acyl-CoA) (**Figure 16**).

La PA peut donner les glycérolipides PG/PI/PS comme précédemment décrit à partir d'un intermédiaire CDP-DAG ; les enzymes impliquées dans la deuxième réaction formant la PI et la PS sont respectivement la CDP-DAG inositol 3-phosphatidyltransferase, CDIPT et la phosphatidylserine synthase, PSS. La PE peut être formée à partir de la PS par une phosphatidylserine decarboxylase (PSD) ou à partir de DAG et de CDP-éthanolamine par une éthanolaminephosphotransferase (EPT) (non montré **Figure 16**). L'ensemble des gènes codant les enzymes décrites ci-dessus, hormis la PSS, ont été identifiés dans le génome des diatomées par homologie de séquences mais les enzymes n'ont pas été caractérisées précisément (pour revue, Tanaka, Yoneda and Maeda, 2022).

La PC est le constituant principal des membranes hors du plaste et est synthétisée par une DAG cholinephosphotransferase (CPT) transférant une phosphocholine d'une CDP choline sur un DAG. Les enzymes et les gènes les codant n'ont pas été identifiés ni caractérisés. La PC peut également être modifiée au niveau de l'acide gras en position *sn*-2. Cette position précise peut être la cible d'une phospholipaseA2 (PLA2) formant une Lyso phosphatidylcholine sur laquelle un nouvel acide gras peut être estérifié par une lyso-phosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT). La PC peut également être rétro-convertie en DAG par une PC:DAG cholinephosphotransferase (PDCT).

La voie de synthèse du bétaine lipide DGTA n'est pas encore connue mais une DGTA synthase a été identifiée chez *Phaeodactylum* (Dolch *et al.*, 2017; Conte *et al.*, 2018).





**Figure 16 : Voies de biosynthèse des lipides extraplastidiaux.** G3P, glycérol-3-Phosphate ; LPA, acide lyso-phosphatidique ; PA, acide phosphatidique ; PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; PC, phosphatidylcholine ; DAG, diacylglycérol ; TAG, triacylglycérol ; DGTA, diacylglycéryl-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)- $\beta$ -alanine ; GPAT, glycérol-sn-3-phosphate acyltransférase ; LPAT, lysophosphatidate acyltransférase ; PAP, acide phosphatidique phosphatase ; DGAT, diacylglycérol acyltransférase ; CPT, DAG-cholinephosphotransférase ; PDCT, PC:DAG-cholinephosphotransférase ; PDAT, phospholipid:diacylglycérol acyltransférase ; LPCAT, acyl-CoA :lysophosphatidylcholine acyltransférase ; PLA2, phospholipase A2. Les rectangles jaunes représentent les chaînes d'acides gras. Les cercles blancs représentent les groupements phosphate. La voie de synthèse *de novo* dite de Kennedy est encadrée en pointillé tandis que la voie d'édition de la PC (Cycle de Lands) est représentée entre parenthèse.

#### 4 Synthèse des TAG

##### 4.1 Synthèse par les DGAT, voie dépendante de l'acyl-CoA

Les DGAT (acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferases) sont les enzymes catalysant la dernière étape dans la synthèse des TAG par la voie de Kennedy (synthèse *de novo*). Ces enzymes estérifient un troisième et dernier acide gras sur un DAG à partir d'un acyl-CoA. Il existe trois familles de DGAT (1,2,3) qui sont chacune présente au moins en une copie dans la plupart des organismes eucaryotes (Liu *et al.*, 2012). Les deux premières sont membranaires, localisées au réticulum endoplasmique tandis que DGAT3 est cytosolique et probablement impliquée dans le flux entre les acyl-CoA cytosoliques et les TAG (Saha *et al.*, 2006; Haslam *et al.*, 2020). Il a été établi que les DGAT constituent une étape limitante dans la formation des TAGs (Li, Yu and Hildebrand, 2010). Pour cette raison et en vue d'applications biotechnologiques, ces enzymes ont été très étudiées dans plusieurs

organismes comme les plantes, les mammifères et les algues (Niu *et al.*, 2016). De manière générale, lorsque l'on augmente l'expression des DGAT, on observe une augmentation dans la production des TAG, même dans des tissus qui n'en accumulent pas naturellement.

Chez les microalgues une seule copie de DGAT1 est généralement présente tandis que des isoformes multiples de DGAT2 ont été prédites (Haslam *et al.*, 2020). On retrouve ainsi 4 DGAT2 chez *Phaeodactylum tricornutum* (Gong *et al.*, 2013) et 12 isoformes chez *Nannochloropsis oceanica* (Vieler *et al.*, 2012; Haslam *et al.*, 2020). Par prédiction de domaines transmembranaires, DGAT1 chez *P. tricornutum* possède davantage de domaines transmembranaires (8 domaines) que DGAT2 (entre 1 et 4 domaines) ce qui correspond aux ordres de grandeurs définis entre les DGAT1 et 2 chez les autres organismes (Guihéneuf *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2013). Dans leurs travaux, Zhang *et al.*, 2021 ont identifié un domaine d'homologie Pleckstrine (domaine PH) du côté N-terminal de PtDGAT1, comme chez d'autres microalgues. La délétion de ce domaine sur la DGAT1 de la microalgue *Myrmezia incisa* aboutit à un effet fort sur la capacité de l'enzyme à synthétiser des TAG lorsqu'elle est exprimée chez la levure (Chen *et al.*, 2015) ce qui suggère une contribution enzymatique de ce domaine PH. Au moins 4 isoformes de DGAT2 ont été identifiées chez *P. tricornutum* (nommées PtDGAT2A, B, C et D, Gong *et al.*, 2013) ; elles présentent peu de similarités de séquences entre elles (19 à 27%).

Enfin, une DGAT3 est identifiée chez *P. tricornutum* (Cui *et al.*, 2013, 2018; Zhang *et al.*, 2021). Cependant, son analyse phylogénétique montre qu'elle ne se place pas avec les DGAT3 des autres organismes (Cui *et al.*, 2013). Une deuxième activité synthétase impliquée dans la formation d'esters de cires (wax ester) a pu être identifiée ce qui peut expliquer qu'elle se place à part des DGAT. Pour cette raison, elle est également nommée PtDGATX (Cui *et al.*, 2018).

#### 4.1.1 Régulation transcriptionnelle des DGAT

Malgré un simple isoforme pour DGAT1, deux variants de transcrits ont été identifiés chez *P. tricornutum* (Guihéneuf *et al.*, 2011). Il semblerait que le transcrit le plus court code l'enzyme fonctionnelle. L'hypothèse proposée est que le transcrit long soit produit dans des conditions de cultures optimales au cours desquelles l'accumulation de TAG n'est pas nécessaire. Lorsque les conditions deviennent limitantes, des mécanismes d'épissage entreraient rapidement en jeu pour produire la version courte du transcrit donnant l'enzyme fonctionnelle (Guihéneuf *et al.*, 2011).

Dans une étude comparant tous les isoformes de DGAT, il est rapporté que la surexpression de PtDGAT2A, PtDGAT2C et PtDGAT2D (à des niveaux équivalents) ne permet pas d'augmenter la quantité totale de TAG chez *P. tricornutum* (Zhang *et al.*, 2021). Au cours d'une culture limitée en azote, l'expression de PtDGAT2A et PtDGAT2B augmente après 4 jours de culture tandis que

l'expression de *PtDGAT2C* et *PtDGAT2D* augmente de manière bimodale à 2 jours puis de nouveau à 6 jours. L'isoforme *PtDGAT3* (*PtDGATX*) montre une augmentation transcriptionnelle très légère après 12h de carence en azote (inférieure à 2 comparé à la condition contrôle).

#### 4.1.2 Localisation des DGAT

Par fusion avec la protéine fluorescente verte, les *DGAT1*, *DGAT2B* et *DGAT3* (*DGATX*) ont été localisées à la fois sur la membrane Epi-plastidiale (EpM) et dans le RE chez *P.tricornutum* (Zhang *et al.*, 2021). Bien que cela ne soit pas mentionné par les auteurs, on observe que *PtDGAT3* (*DGATX*) semble se concentrer également dans une région entre le plaste et le noyau (Zhang *et al.*, 2021).

#### 4.1.3 Etudes fonctionnelles et spécificités de substrat

*DGAT1* favorise l'incorporation des acides gras saturés (C16:0 et C18:0) dans les TAG lorsqu'elle est exprimée en levure (Guihéneuf *et al.*, 2011) mais permet également d'incorporer des VLC-PUFA (C20:5). C'est également l'isoforme présentant l'activité enzymatique la plus forte sur les acyl-CoA C16:0, C16:1, C20:5. Son étude fonctionnelle par surexpression permet de doubler la quantité de TAG produite chez *P.tricornutum*.

Dans une lignée de levure quadruple mutante ne formant pas de TAG (lignée H1246 : *dga1Δ lro1Δ are1Δ are2Δ*), seule *PtDGAT2B* permet de restaurer la formation de TAG (Gong *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2021). *PtDGAT2B* permet également l'incorporation d'acides gras insaturés (EPA) dans les TAG chez la levure. En revanche, lorsque *PtDGAT2A* est surexprimé (facteur 6,5 en ARNm) chez *P.tricornutum*, une augmentation des acides gras mono et poly insaturés est observée (respectivement augmentation de 35,6% et de 34,8%. Niu *et al.*, 2016). La surexpression de *PtDGAT2D* permet une augmentation de la quantité de TAG d'un facteur 2 tandis que la croissance est 15% plus lente (Dinamarca *et al.*, 2017).

La surexpression de *DGAT3* chez *P.tricornutum* permet une augmentation de la quantité totale de lipides quelle que soit la disponibilité d'azote ce qui permet de supposer qu'elle ne soit pas spécifique du stress azote. Cette surexpression permet également de détecter des ester de cires (2,83%) auparavant indétectables (Cui *et al.*, 2018). Son activité DGAT reste dominante avec une préférence de substrat pour des acides gras de la forme C16 :1 et C18 :1 lorsqu'elle est exprimée en levure (Zhang *et al.*, 2021).

#### 4.2 Synthèse des TAG par les voies indépendantes de l'acyl-CoA

Une autre voie alternative à la voie de Kennedy aboutissant à la formation des TAG est très vraisemblablement présente chez les diatomées comme c'est le cas chez les plantes. Cette voie permettrait de transférer un groupement acyl en position *sn-2* d'un glycérolipide directement sur un DAG pour former une molécule de TAG. Ce transfert est assuré par exemple à partir d'une PC par une

phospholipid:diacylglycérol acyltransférase (PDAT) formant ainsi un Lyso-PC et un TAG (**Figure 16**). Les galactolipides peuvent également être utilisés comme donneurs d'acyl par le même mécanisme (Zhang *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2012; Zienkiewicz and Zienkiewicz, 2020). Deux isoformes putatifs de PDAT (Phatr3\_J8860, Phatr3\_J49706) ont été identifiés chez *Phaeodactylum* (Mus *et al.*, 2013; Alipanah *et al.*, 2015) mais n'ont pas été caractérisés. Ces voies indépendantes de l'acyl-CoA ne sont pas encore bien comprises et nécessitent davantage de caractérisation.

Ensemble, ces données suggèrent une régulation précise dans l'accumulation des TAG par différentes voies de biosynthèse. Par exemple, les différents isoformes de DGAT2 présents chez les microalgues interviennent probablement de manière spécifique selon les stress que rencontrent les microalgues et semblent privilégier différents acides gras en tant que substrats.

## 5 Catabolisme des triacylglycerols

La dégradation des lipides neutres ou des lipides membranaires, de manière générale, est un processus important du métabolisme permettant de récupérer d'une part, de l'énergie et d'autre part, des précurseurs pour la synthèse *de novo* d'acides gras ou de lipides. Deux mécanismes distincts peuvent intervenir 1) la lipolyse suivie de la  $\beta$ -oxydation et 2) l'autophagie aussi appelée lipophagie lorsqu'elle concerne les LD.

### 5.1 Hydrolyse des acides gras

La lipolyse permet l'hydrolyse des acides gras qui peuvent être réutilisés pour la biosynthèse des lipides membranaires ou bien qui vont être pris en charge par la  $\beta$ -oxydation afin de récupérer des briques élémentaires d'acétyl-CoA ainsi que du pouvoir réducteur (NADH et FADH<sub>2</sub>). Les lipases sont une famille enzymatique très répandue dans l'arbre du vivant qui assurent l'hydrolyse des acides gras (Li, Pan and Hu, 2018).

Chez *S.cerevisiae*, plusieurs TAG lipases (Tgl3p, Tgl4p, Tgl5p) sont localisées à la LD et les mutants TGL3 ou TGL4 présentent une augmentation de TAG (Athenstaedt and Daum, 2003, 2005). Le même phénotype est observé chez *A.thaliana* avec la lipase Sugar Dependant 1 (SDP1) dans des graines en germination (Eastmond, 2006). Toutes ces lipases appartiennent au groupe des SDP1-patatin-like lipases, qui inclut également la TAG lipase ATGL chez l'Homme (Barka *et al.*, 2016). Chez *P.tricornutum*, une TAG lipase Tgl1 a été identifiée par homologie de séquence avec SDP1 d'*Arabidopsis* et son Knock Down mène à une accumulation de TAG surtout pendant la phase stationnaire (Barka *et al.*, 2016). Sa localisation n'a pas été analysée. En revanche, une autre lipase, OmTGL, a été identifiée par Li, Pan and Hu, 2018 qui l'ont localisée sur la troisième membrane du plaste (OEM, Outer Enveloppe Membrane). Les lignées Knock Down pour OmTGL présentent des TAG

enrichis en EPA (C20:5), ce qui suggère notamment que cette lipase soit impliquée dans l'hydrolyse TAG contenant des VLC-PUFA.

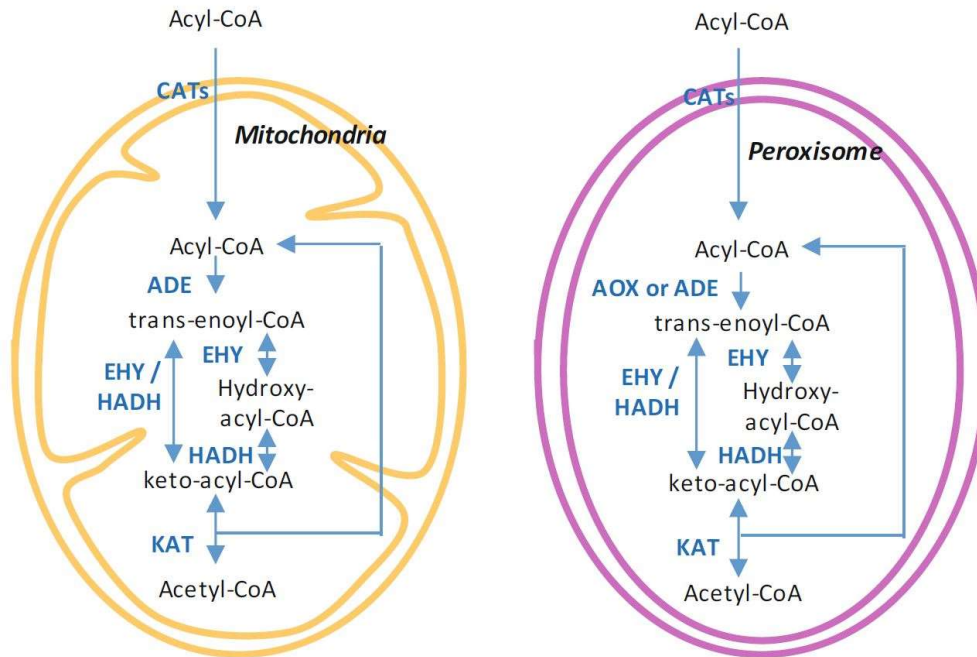
Une autre protéine lipase présentant plusieurs activités enzymatiques (acyltransferase, phospholipase et lipase) a été identifiée et caractérisée dans un premier temps chez *T.pseudonana*. Elle a été nommée Comparative Gene Identification (CGI-58) en référence à la protéine homologue humaine (Trentacoste *et al.*, 2013) et un homologue a également été identifié chez *P.tricornutum* (Bowler *et al.*, 2008; Calleja, Leterrier and Marechal, 2015). Les mutants Knock down CGI-58 chez *T.pseudonana* présentent une accumulation de TAG ainsi que des LD plus importantes en taille dans plusieurs conditions de culture. Alors que CGI-58 est localisé à la LD ou au peroxisome chez les animaux et les plantes, elle a récemment été localisée à la mitochondrie chez *P.tricornutum* (Shu, Pan and Hu, 2023).

Enfin, une récente analyse bio-informatique a permis d'identifier 57 TAG lipases putatives, dont les prédictions de localisation sont majoritairement cytosoliques (35 protéines) chez *P.tricornutum* (Murison, Hérault, Schoefs, *et al.*, 2023). Les 22 autres protéines candidates sont prédites comme ER/cytosoliques (9), plastidiales (3), ER (3), mitochondriales (3), peroxisomales (3) et mitochondrie/peroxisome (1). Néanmoins, aucun outil bio-informatique ne permet de prédire une localisation à la LD. Comme un seul candidat (Phatr3\_J43352) a été expérimentalement retrouvé dans le protéome de LD purifiées en carence d'azote chez *Phaeodactylum* (Leyland *et al.*, 2020), il est possible que la plupart des lipases ne soient adressés à la LD que lorsque les conditions optimales sont rétablies et que la remobilisation des TAG a lieu.

## 5.2 Catabolisme des acides gras par la $\beta$ -oxydation

Chez les plantes, la  $\beta$ -oxydation (ou spirale de Lynen) a lieu dans le peroxisome alors que chez les diatomées, elle peut avoir lieu à la fois dans la matrice mitochondriale et dans le peroxisome (Chauton *et al.*, 2013; Jallet *et al.*, 2020).

Les acides gras hydrolysés depuis un lipide membranaire ou un TAG sont d'abord activés sous une forme acyl-CoA par une longue chaîne acyl-CoA synthetase (LACS) (Li-Beisson *et al.*, 2019). Les acyl-CoA sont transportés dans la mitochondrie ou dans le peroxisome par des carnitines acyltransferases de catégories I ou II (CATs, **Figure 17**). Les étapes suivantes sont très similaires entre la mitochondrie et le peroxisome, la seule différence réside dans l'enzyme catalysant la première étape (**Figure 17**).



**Figure 17 : Schéma des voies de dégradation des Acyl-CoA par la  $\beta$ -oxydation peroxisomale ou mitochondriale chez les diatomées.** CATs, carnitine acyltransferases I and II ; ADE, acyl-CoA dehydrogenase ; AOX, acyl-CoA oxidase ; EHY, enoyl-CoA hydratase ; HADH, 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase ; KAT, 3-ketoacyl-CoA thiolase. D'après (Tanaka, Yoneda and Maeda, 2022).

La première étape consiste à ajouter une double liaison entre les carbones C2 (aussi appelé carbone  $\beta$ , donnant son nom à la  $\beta$ -oxydation) et C3, réaction catalysée soit par une acyl-CoA déshydrogénase (ADE, mitochondriale) soit par une acyl-CoA oxidase (AOX, peroxisome), ce qui génère un trans-enoyl-CoA. Au cours de la deuxième étape, un groupe hydroxyl est fixé au carbone C3 par une enoyl-CoA hydratase (EHY) pour former un hydroxyacyl-CoA. La troisième étape permet de former du keto-acyl-CoA par déshydrogénation de l'hydroxyacyl-CoA par l'enzyme 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH). Les étapes deux et trois peuvent être réalisées simultanément par une enzyme bifonctionnelle EHY/HADH. Enfin, une molécule d'acétyl-CoA est libérée par thiolyse par l'enzyme 3-ketoacyl-CoA thiolase (KAT) ce qui raccourcit la chaîne d'acide gras acyl-CoA de deux carbones. La chaîne raccourcie peut alors subir un nouveau cycle d'oxydation.

### 5.3 Dégradation des LD par autophagie

L'autophagie est un procédé catabolique conservé entre les espèces qui permet la dégradation et le recyclage de molécules isolées ou bien d'organites entiers au sein des lysosomes (cellules animales) ou des vacuoles (plantes et levures) (Zienkiewicz and Zienkiewicz, 2020). L'autophagie est largement impliquée dans l'homéostasie de la LD sur deux volets : soit pour fournir à la LD des acides gras issus de la dégradation des membranes et permettre sa biogenèse, soit dans le cas de la lipophagie pour sa dégradation. En effet, lorsque l'autophagie concerne les LD, le terme lipophagie est utilisé. On en distingue deux types, la macro-lipophagie et la micro-lipophagie. La macro-lipophagie implique que

des protéines reliées à l'autophagie (Autophagie Related, ATGL) induisent l'encapsulation des LD dans une structure entourée par une double membrane appelée autophagosome. Ces autophagosomes pénètrent dans la vacuole pour dégradation. La micro-lipophagie permet, en revanche, une dégradation plus directe des LD en incorporant tout ou partie de la LD dans la vacuole par une invagination de la membrane de celle-ci.

Chez les algues vertes et notamment chez *C.reinhardtii*, des processus assimilables à la micro et la macro-lipophagie ont pu être observés (Tsai *et al.*, 2018; Kajikawa *et al.*, 2019). Une protéine ATG8 impliquée dans la formation du phagosome a été identifiée et sa mutation mène à une remobilisation des TAG affectées en sortie de carence nutritionnelle par rapport à la souche sauvage (Kajikawa *et al.*, 2019). Chez l'eustigmatophyte *N.oceanica*, des processus de microlipophagie ont été observés et en parallèle il a été mis en évidence que *NoATG8* (macro-lipophagie) interagit avec *NoLDSP*, une protéine majeure de la LD chez cette microalgue (Zienkiewicz *et al.*, 2020). Cette interaction pourrait être impliquée dans l'adressage de la LD à la vacuole. De manière extrêmement intéressante, un motif d'interaction avec ATG8 a été identifié sur la séquence protéique de *StLDP*, la protéine majoritaire de la LD de *Phaeodactylum* (Leyland *et al.*, 2020). En sortie de carence, les mutants *StLDP* présentent également des troubles dans la remobilisation des LD.

Les relations entre autophagie, lipolyse et homéostasie de la LD chez les diatomées commencent seulement à susciter de l'intérêt. Par contraste avec les nombreux travaux menés sur la caractérisation des voies métaboliques permettant de former des lipides chez les microalgues, très peu se sont intéressés à leur dégradation et à en comprendre les voies sous-jacentes. Cet aspect du métabolisme n'est certainement pas à négliger notamment pour les secteurs industriels qui envisagent d'exploiter les lipides issus de microalgues (acides gras essentiels pour la nutrition humaine, biocarburants...).

## Applications industrielles des microalgues

Le potentiel des microalgues suscite de plus en plus d'intérêts dans de nombreux domaines. Leur immense diversité permet d'ouvrir des champs d'applications variés et les travaux devraient être conduits d'abord par l'identification de souches naturellement efficace pour l'application visée sans nécessiter de modifications génétiques. Afin d'améliorer leurs potentiels, des modifications génétiques peuvent être envisagées, faisant alors intervenir une dimension légale à prendre en compte qui varie en fonction des pays. Ci-dessous, nous donnons des exemples d'utilisations et d'applications pour les microalgues de manière générale.

### 1 Utilisation de microalgues

#### 1.1 *Dépollution d'eaux usées*

Depuis la Révolution industrielle, les sols, les milieux aqueux et les milieux aériens subissent une pollution importante par les activités anthropiques. Les milieux aqueux peuvent être contaminés par des polluants organiques persistants qui entrent à la base de la chaîne alimentaire et peuvent se bio accumuler tout au long de cette dernière. La bio accumulation correspond à l'enrichissement croissant d'un composé à chaque étape de la chaîne alimentaire ; les concentrations initiales peuvent ainsi être faibles au début mais importantes en fin de chaîne, ce qui peut se révéler toxique pour l'Homme ou l'animal si le produit final est destiné à la consommation. Ces polluants peuvent être de l'ordre des produits chimiques, de molécules polycycliques, d'hydrocarbures, de bisphénols (Plöhn *et al.*, 2021)...

Chaque milieu va contenir des polluants différents à identifier pour sa dépollution. Par exemple, les eaux usées domestiques contiennent principalement des matières organiques facilement dégradables ainsi que des traces de produits chimiques et pharmaceutiques. Les eaux usées issues de l'agriculture vont contenir des pesticides, herbicides ainsi qu'une forte concentration d'engrais azotés et phosphatés notamment, qui favorisent, par ailleurs, l'explosion de micro-organismes lorsque ces composés se déversent dans les milieux ouverts comme les rivières, les lacs... Enfin, la pollution des eaux par l'industrie peut présenter, par exemple, une forte concentration en produits chimiques, métaux lourds, produits pharmaceutiques....

L'utilisation de microalgues semble alors particulièrement appropriée pour la dépollution de ces milieux de par leur capacité à absorber et à assimiler les composés azotés, phosphatés, chimiques, métaux lourds. Certains dispositifs sont commercialement disponibles (voir pour revue Plöhn *et al.*, 2021) et les techniques permettant d'associer la culture de microalgues à son application sont très variées. Les genres de microalgues principalement utilisées sont le genre *Chlorella* qui est une algue verte s'adaptant très facilement à de nombreuses conditions de culture et résistantes face à



plusieurs polluants. Les algues vertes *Scenedesmus quadricauda* absorbent efficacement les métaux lourds et *Botryococcus braunii* ou *Nannochloris* sp permettent de co-produire des composés d'intérêts (lipides) en même temps que la dépollution de produits chimiques (Plöhn *et al.*, 2021).

## 1.2 Production de biocarburants

Tous les organismes photosynthétiques sont capables de produire des lipides dont des huiles (sous la forme de triacylglycérols, TAG, (cf. Métabolisme lipidique chez les diatomées) dans des proportions différentes par rapport à leur masse sèche : entre 7 et 10% pour les cyanobactéries, 15 à 75% pour des microalgues vertes (endosymbiotes secondaires), 16 à 68% pour les chromalvéolées (endosymbiotes secondaires) (Cadoret and Bernard, 2008; Maréchal, 2021). Outre leur rendement en production, certaines conditions doivent être respectées afin de les envisager et de les utiliser dans les domaines des biocarburants.

Les chaînes carbonées d'acides gras composant les TAG doivent présenter un faible nombre de double liaisons couplées à une longueur de chaîne compatible avec l'application souhaitée. Ces longueurs de chaînes définissent le point d'ébullition de l'alcane considéré. Par exemple, une chaîne inférieure à C8 est vaporisable (sous forme de gaz) à température ambiante, liquide jusqu'à C18, et solide au-delà de C19 (Maréchal, 2021). Ainsi les kérosènes se situent dans la portion C12-C15 puis les diesels et carburants lourds et enfin les lubrifiants (paraffines, goudrons, asphaltes). Une balance doit ainsi être trouvée pour des utilisations en tant que Jetfuels entre point d'ébullition, point d'inflammabilité (environ 38°C pour les kérosènes de type JetA-1), point d'auto-inflammabilité (environ 245°C) et une densité énergétique conséquente.

Les défis actuels pour la production de biocarburants à base d'algues oléagineuses reposent donc sur plusieurs aspects et verrous qui doivent être résolus afin de les exploiter pleinement et de manière économiquement viable. Les longueurs de chaînes carbonées doivent être compatibles avec les propriétés recherchées citées précédemment mais peuvent en parallèle causer des défauts majeurs dans la physiologie de l'algue. Par exemple, nous avons vu que les acides gras majoritaires chez *P.tricornutum* sont les C16:0, C16:1 et les C20:5 (Abida *et al.*, 2015). Si la longueur souhaitée pour leur utilisation en tant que Jetfuels est de l'ordre de C8 – C14, des travaux majeurs doivent être menés pour permettre aux micro-organismes de tolérer ces longueurs d'acides gras sans perturber radicalement leur physiologie et notamment leur croissance. Elles doivent, en outre, accumuler ces chaînes en grandes quantités.

Enfin, pour le moment les procédés d'extractions reposent majoritairement sur l'utilisation de solvants organiques (par exemple chloroforme, méthanol) pour solubiliser les huiles. De plus, les

procédés de récoltes de la biomasse, séchage, broyage et extraction restent des étapes très énergivores qui impactent directement le rendement économique.

### 1.3 *Autres applications notables*

D'autres applications des microalgues dans l'alimentation humaine et animale sont également envisagées puisque les microalgues sont riches en huiles mais également en protéines, ou en pigments aux propriétés antioxydantes par exemple.

Concernant les lipides, on évoquera les VLC-PUFA (par exemple C20 :5 riche chez *P.tricornutum*) qui sont majoritairement apportés par l'alimentation chez l'Homme et qui sont essentiels pour le métabolisme en respectant une balance  $\omega_6/\omega_3$  (ratio optimale de 3/4, Li-Beisson *et al.*, 2019). En effet, une consommation accrue de PUFA  $\omega_3$  est nécessaire dans les régimes occidentaux, car la balance  $\gamma$  est fortement affectée en faveur des  $\omega_6$ . Ces  $\omega_3$  sont riches dans les poissons qui les acquièrent eux-mêmes depuis les microalgues dont ils se nourrissent. Pour faire face aux problèmes de surpêche mondiale, la production de ces lipides directement par les microalgues et leur apport dans l'alimentation humaine *via* des compléments alimentaires peut permettre de pallier ce manque et restaurer la balance.

D'autres coproduits comme les carbohydrates (sucres) stockés dans l'amidon de certaines algues ou des polysaccharides dans la paroi cellulaire peuvent être exploités (Draaisma *et al.*, 2013) ainsi que des molécules à haute valeur ajoutée comme les caroténoïdes (fucoxanthine, astaxanthine) ou les tocophérol.

## 2 Techniques de cultures industrielles

Les conditions de culture au sein de nos laboratoires de recherche nécessitent une mise en œuvre relativement simple et des volumes de cultures compris entre quelques millilitres et quelques litres, ce qui est suffisant pour des caractérisations à l'échelle cellulaire ou moléculaire habituellement conduites dans cet environnement. Les volumes de culture requis par l'industrie sont nettement supérieurs et les différences de conditions de culture entre laboratoires de recherche et « upscale » industriels ne permettent souvent pas de retrouver les mêmes propriétés biologiques et rendements qui étaient observées à des échelles inférieures. De lourds procédés d'optimisation de culture sont ainsi nécessaires pour conserver les mêmes propriétés entre les deux environnements.

La culture de microalgues à l'échelle industrielle est réalisée de différentes manières. On peut retrouver des cultures dans des bassins ouverts en extérieur ce qui permet de cultiver une biomasse importante, et d'utiliser l'énergie lumineuse naturelle pour la croissance des microalgues. En revanche ces bassins sont sujets à l'évaporation ce qui nécessite un approvisionnement en eau régulier et sont également source de contamination biologique. Cette contamination peut se faire

dans les deux sens : des organismes opportunistes non désirés peuvent coloniser le bassin et entrer en compétition avec l'organisme d'intérêt cultivé. À l'inverse l'organisme d'intérêt peut échapper au bassin et coloniser l'environnement ce qui empêche par exemple, la culture d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ou la culture d'espèces potentiellement dangereuses pour l'environnement.

D'autres techniques de cultures en photo bioréacteurs sont ainsi développées pour s'affranchir des problèmes évoqués précédemment mais sont en contrepartie plus coûteux. Les photo bioréacteurs sont des enceintes closes qui communiquent avec l'extérieur de manière contrôlée. Les échanges liquides ou gazeux sont filtrés ce qui permet de garder le contrôle précis sur les paramètres de culture. Le risque de contamination est très limité. Ces photo bioréacteurs peuvent être de formes très variées : en colonnes, en panneau plat, en sac plastique, en système tubulaire. Le principal défi est d'optimiser la surface d'exposition de la culture à la lumière (naturelle ou artificielle).

### 3 Expulsion de composés d'intérêt hors de la cellule

L'extraction est une étape cruciale dans l'exploitation des molécules d'intérêt précédemment décrites. La grande majorité des processus d'extractions débutent tous par une étape de lyse cellulaire (mécanique, physique, chimique, enzymatique, pour revue voir Lee, Lewis and Ashman, 2012). Certains paramètres mécano physiques peuvent être modulés pour tenter de maintenir les cellules en vie mais la grande majorité des techniques ne le permettent pas. Ce point est problématique du point de vue du rendement, car l'amplification de la biomasse est relativement longue. Ainsi de nouvelles stratégies visant à faire expulser les produits d'intérêts générés par la cellule directement dans le milieu extracellulaire afin de ne récolter que ces derniers sont envisagées. Ces stratégies sont qualifiées de « traite de microalgues » (en anglais « milking algae ») et sont reviewés par Vinayak *et al.*, 2015 en ce qui concerne les diatomées.

Il a été observé pour la souche de diatomée *Diadesmis confervaceae* que des cellules pouvaient sécréter naturellement de l'huile lorsque la concentration cellulaire dépassait une certaine quantité relative (14,6% d'huile) (Vinayak *et al.*, 2014). Chez d'autres micro algues dont la diatomée *Terpsinoë musica*, le même phénomène d'expulsion a été observé lorsqu'une contrainte mécanique était exercée sur la paroi cellulaire, par exemple entre lame et lamelles au cours d'une observation microscopique (Stoermer, E.F and Julius, M.L., 2003; Vinayak *et al.*, 2015). Des recherches pour comprendre précisément les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces observations sont néanmoins nécessaires pour exploiter correctement ce potentiel.

## Les Gouttelettes Lipidiques

La section introductive sur les gouttelettes lipidiques (LD) est composée du chapitre 5 « Gouttelettes lipidiques chez les plantes : Plus qu'un simple stockage d'huile » publié dans Advances in Botanical Research Volume 101 en 2022. J'ai pu participer à la rédaction de plusieurs parties de cet article de revue durant ma deuxième année de thèse.

L'article présente ainsi une introduction générale sur les LD (partie 1) dans les plantes ainsi que les algues notamment sur les aspects de composition et de biogenèse (partie 2 de l'article), de fonctions dans des conditions normales ou de stress abiotiques (partie 3). Une quatrième partie présente le rôle particulier de la LD 1) soit en tant que plateforme pouvant être détournée au profit d'agents pathogènes lors d'infections et 2) soit en tant que plateforme de synthèse de molécules immunitaires dans les organismes photosynthétiques. Ma contribution a porté sur les parties 1, 2 et 4.

Cet article permet ainsi de faire le lien entre les parties introductives sur les diatomées, leur métabolisme des lipides et la partie introductive sur la Seipin et son rôle dans la biogenèse des LD qui suit l'article de revue.

*nb.* La pagination de l'article de revue est indépendante du manuscrit.

# Lipid droplets in plants: More than a simple fat storage

Damien Le Moigne, Nolwenn Guéguen, and Juliette Salvaing\*

Université Grenoble-Alpes, CEA, INRAE, CNRS, IRIG, LPCV, Grenoble, France

\*Corresponding author: e-mail address: juliette.salvaing@cea.fr

## Contents

1. Introduction	2
2. Lipid droplets composition and biogenesis	3
2.1 Lipid droplet biogenesis	3
2.2 Lipid droplet associated proteins	8
3. Functions for lipid droplets in normal conditions and abiotic stress	9
3.1 Lipid droplets as a source of carbon	9
3.2 Lipid droplets, lipid synthesis and lipid remodeling	10
3.3 Lipid droplets and cell protection	15
3.4 Lipid droplets, a reserve to restart	16
3.5 Lipid droplets and brassinosteroid signaling	17
4. LD and biotic stress	18
4.1 Hijacking of the host metabolism	18
4.2 Lipid droplets as defense organelles	19
5. Conclusion	22
Acknowledgements	24
References	24

## Abstract

Lipid droplets (LDs) are found in all lineages of living organisms, whether prokaryotes or eukaryotes. Their structure is rather simple with a core of hydrophobic molecules, mostly Triacylglycerols and Sterol Esters, surrounded by a monolayer of polar lipids with associated proteins. They are constitutively present in storage organs, such as seeds in plants, or adipose tissue in mammals, while they can form in response to various abiotic or biotic stresses in other plant organs and in microalgae. Their biogenesis has been mostly studied in yeast and animals, yet remains poorly understood in plants. In particular, the central role of the photosynthetic plastid in lipid metabolism raises questions about its role in LD biogenesis. Over the years, many functions of LDs have emerged in addition to the obvious role in carbon and energy storage. While some functions appear broadly distributed among organisms and organs, other appear specific to certain

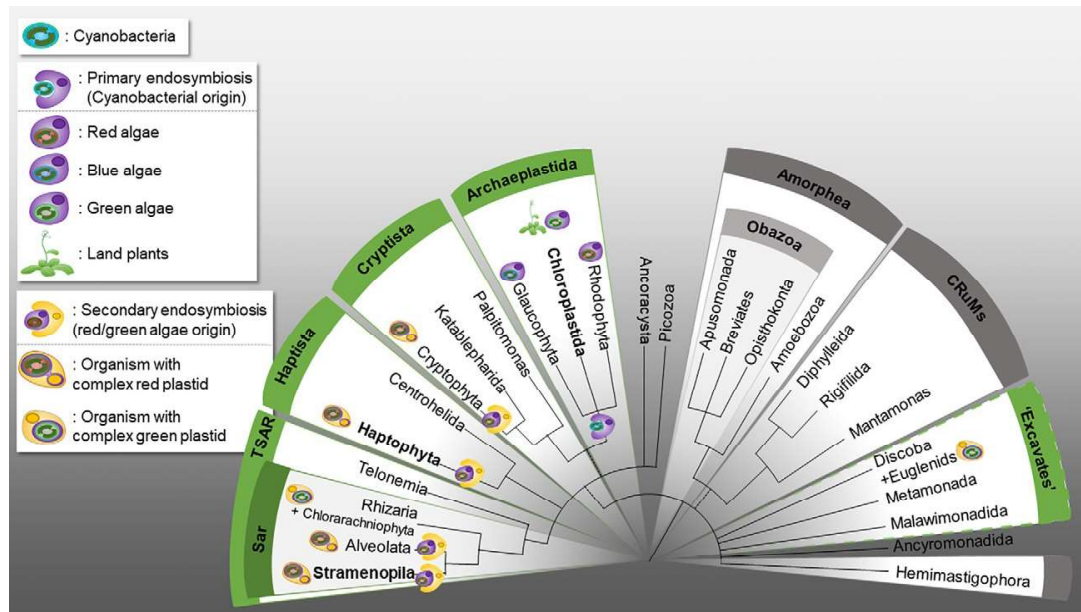
tissues and/or lineages. The present review aims at highlighting specific aspects of LD biogenesis and functions in all photosynthetic organisms, from the historic model plant *Arabidopsis thaliana* to emerging secondary endosymbiont models such as the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.



## 1. Introduction

Lipid Droplets are intracellular lipid inclusions that can be found in very different organisms, and are present in almost all clades composing the tree of life, from Archaea and Bacteria to eukaryotic cells (Lundquist, Shivaiah, & Espinoza-Corral, 2020; Lupette & Maréchal, 2020; Murphy, 2012). These structures have been observed and described for the first time in the late 19th century (Altmann, 1894) and were originally called microsomes or liposomes, but they also have been referred to as lipid bodies, lipid droplets, adiposomes, granules, oleosomes or oil bodies (Murphy, 2012), depending on the research field, or on the considered organisms or tissues. We will adopt the increasingly used term Lipid Droplets (LDs) in the present review. LDs can be categorized in three different classes depending on their subcellular location (Lundquist et al., 2020). “Cytoplasmic LDs” are present in eukaryote’s cytoplasm, “Prokaryotic LDs” in prokaryote’s cytoplasm and Plastid LDs, also called plastoglobules, in the plastids of photosynthetic eukaryotes. We will restrict ourselves to the study of Cytoplasmic LDs in eukaryotic photosynthetic organisms, while plastoglobules are discussed in chapter “Plastoglobules: A hub of lipid metabolism in the chloroplast”.

Photosynthetic organisms are characterized by the presence of a plastid, which can derive from a primary symbiotic event (Archaeplastida that regroup land plants, green, blue and red algae) or from a secondary endosymbiosis event (Guéguen, Le Moigne, Amato, Salvaing, & Maréchal, 2021; Petroutsos et al., 2014) (Fig. 1). In pluricellular organisms, LDs can be found in various tissues. This great variety is reflected in the composition, biogenesis and main roles of LDs. Many recent reviews (Chapman, Aziz, Dyer, & Mullen, 2019; Guéguen et al., 2021; Ischebeck, Krawczyk, Mullen, Dyer, & Chapman, 2020; Leyland, Boussiba, & Khozin-Goldberg, 2020) have explored the composition and biogenesis pathways of LDs in plants and/or microalgae, of which we give a rapid overview before discussing more extensively the functions of LDs in these organisms.



**Fig. 1** Photosynthetic organisms in the tree of Life. Different endosymbiosis events leading to the formation of photosynthetic organisms are represented on the eukaryotic tree of life. Archaeplastida result from a single endosymbiotic event, engulfment of a cyanobacteria by a heterotrophic eukaryote. They are composed of blue algae (Glaucophyta), red algae (Rhodophyta) and Chloroplastida. The latter contains both land plants and green algae, such as *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella* sp. and *Chromochloris zofingiensis*. Several independent secondary endosymbiosis events involving different heterotrophic eukaryotes and either green or red algae have later taken place and given rise to a great variety of photosynthetic organisms, commonly known as microalgae. Studies cited in the review concern mostly Stramenopila including *Nannochloropsis oceanica* and the diatoms *Fistulifera solaris* and *Phaeodactylum tricorutum*, but also Haptophyta such as the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. Tree topology adapted from Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., and Simpson, A. G. B. (2020). The new tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 35, 43–55. doi:10.1016/j.tree.2019.08.008.

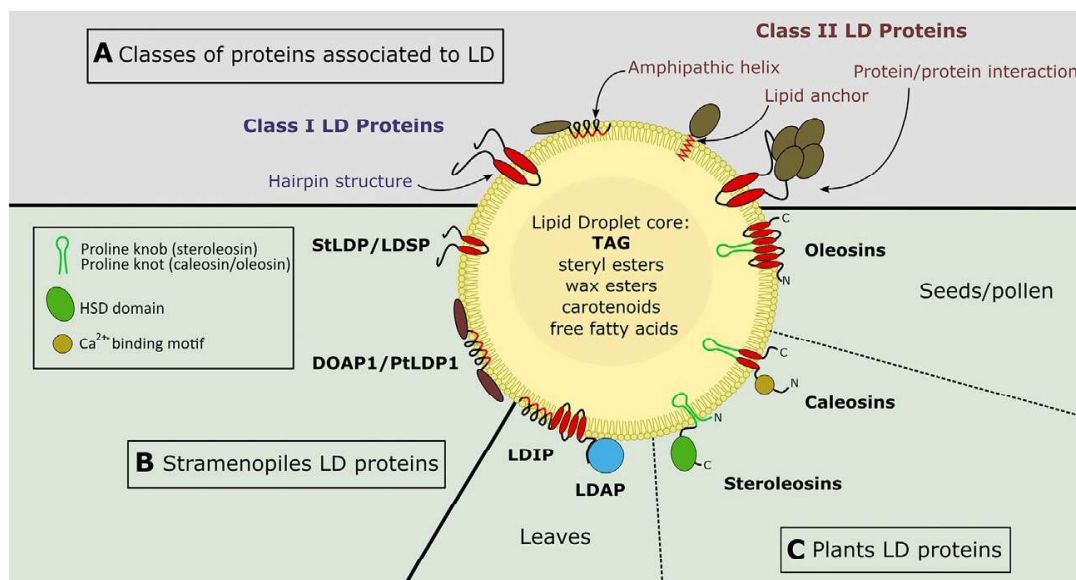


## 2. Lipid droplets composition and biogenesis

LDs contain a hydrophobic core composed of neutral lipids such as Triacylglycerols (TAGs) and Steryl Esters (SEs) and surrounded by a glycerolipid monolayer surface with associated or embedded proteins, which most often play structural or metabolic roles but can have other functions as we will discuss later (Huang, 2018) (Fig. 2).

### 2.1 Lipid droplet biogenesis

LD biogenesis is dependent on and starts with the core lipids synthesis. TAG synthesis takes place between the two leaflets of the ER membrane

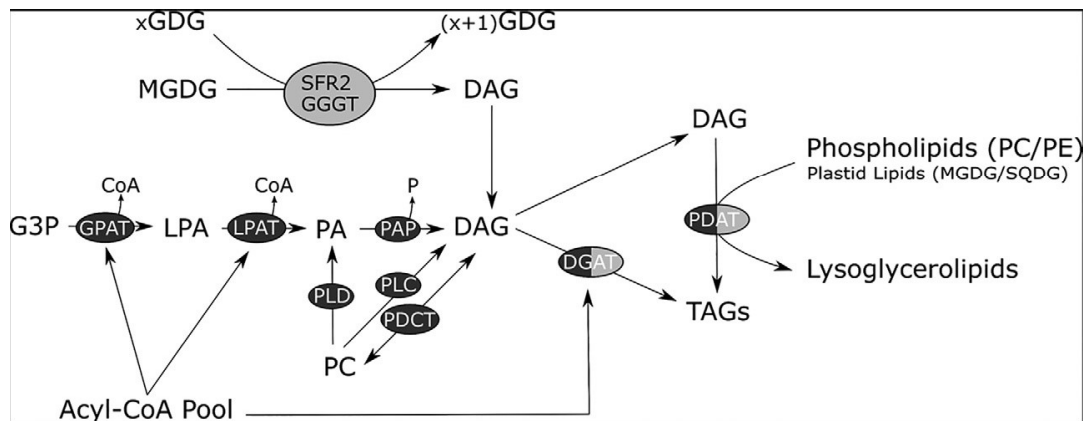


**Fig. 2** Structure and content of LDs. The LD core is mainly composed of TAGs with very diverse fatty acid compositions, and steryl esters. Other hydrophobic compounds can be found, such as wax esters in certain land plants, and carotenoids and free fatty acids in some algae. Different classes of proteins can be found at the surface (A) and LD major proteins differ between organisms/tissues (B and C). (A) The different classes of proteins associated to the LD. Class I LD proteins are initially inserted via an hydrophobic hairpin structure in the ER membrane and are later transferred to the LD. Class II proteins are present in the cytosol and can become associated with the LDs. This association can be mediated by an amphipathic helix, or indirect, through protein-protein interaction or addition of a lipid anchor by post-translational modifications. Hydrophobic regions that mediate interaction with the droplet are indicated in red. (B) Major LD proteins in Stramenopiles. Predictions of major lipid droplet proteins in stramenopiles suggest that StLDP (*Phaeodactylum tricornutum*) and LDSP (*Nannochloropsis s.l.*) are class I proteins, with two hydrophobic  $\alpha$ -helices forming a hairpin. On the other hand, DOAP1 (*Fistulifera solaris*) and PtLDP1 (*Phaeodactylum tricornutum*) are class II proteins; they do not contain a clear hydrophobic region but the central region is predicted to form an amphipathic  $\beta$ -barrel. (C) Major LD proteins in plants. Oleosins are the major and the most abundant proteins of seeds and pollen LD, while Caleosins and Steroleosins are less abundant but found in all plant tissues. Oleosins and Caleosins are class I proteins, strongly anchored in the LD through several hydrophobic  $\beta$ -sheets that form hairpin structures. They also contain a central "Proline knot" that penetrates into the LD core and is essential for targeting the Oleosins to the LD. Steroleosins are anchored to the LD by a "Proline knob" that mainly associates with the LD surrounding monolayer. Plant leaf LDs are mainly covered by LDAPs and LDIP. LDIP is a class I protein with four transmembrane domains, while LDAPs are class II proteins that associate to the LD surface through their interactions with LDIP. Panel (A) adapted from Dhiman, R., Caesar, S., Thiam, A. R., & Schrul, B. (2020). Mechanisms of protein targeting to lipid droplets: a unified cell biological and biophysical perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.03.004>. Panel (B) adapted from Guéguen, N., Le Moigne, D., Amato, A., Salvaing, J., & Maréchal, E. (2021). Lipid droplets in unicellular photosynthetic stramenopiles. *Frontiers in Plant Science*, 12, 639276 <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.639276>. Panel (C) adapted from Shao, Q., Liu, X., Su, T., Ma, C., & Wang, P. (2019). New insights into the role of seed oil body proteins in metabolism and plant development. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1568 <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01568> and Chapman, K. D., Aziz, M., Dyer, J. M., & Mullen, R. T. (2019). Mechanisms of lipid droplet biogenesis. *The Biochemical Journal*, 476(13), 1929–1942. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180021>.



(Walther, Chung, & Farese, 2017). They can be synthesized *de novo* by the Kennedy pathway, which is conserved across eukaryotes (Chapman & Ohlrogge, 2012). Briefly, fatty acids (FA) synthesized in the plastid are transported to the ER, where they are esterified on glycerol-3-phosphate. Glycerol-3-phosphate acyl transferases (GPATs) catalyze the first esterification on position sn-1 to form lysophosphatidic acid (LPA), then lysophosphatidic acid acyl transferases (LPATs) esterify a second fatty acid on position sn-2 to generate phosphatidic acid (PA). PA's polar head can be further modified to form other phospholipids such as phosphatidylglycerol (PG) or removed by phosphatidic acid phosphatases (PAPs) to generate diacylglycerol (DAG), the latter serving as a platform for most glycerolipids synthesis. DAG can also be generated by recycling of other glycerolipids through different pathways that are presented in Fig. 3. The last reaction to form TAG is then catalyzed by diacylglycerol acyl transferases (DGATs), which esterify a third fatty acid on the sn-3 position of DAG. These three successive acyl esterifications are using acyl-CoAs as donor substrates. Alternatively, TAG can be formed directly by transferring a fatty acid from the sn-2 position of a donor glycerolipid (generally Phosphatidylcholine (PC)) to the sn-3 position of DAG, a reaction catalyzed by phospholipid:diacylglycerol acyl transferases (PDATs) (Fig. 3). Other core lipids include Steryl Esters (SEs) or wax esters (Baud, 2018; Chapman & Ohlrogge, 2012; Ferrer, Altabella, Arro, & Boronat, 2017) and are also synthesized in the ER membrane of plant cells (Ischebeck et al., 2020).

When TAG and/or SE reach a certain concentration, they condense into lenses at specific nucleation sites (Choudhary, Ojha, Golden, & Prinz, 2015; Thiam & Forêt, 2016). LD nucleation is favored at points showing higher membrane curvature, especially in ER tubules, and can be modulated by several proteins, in particular Seipin (Santinho et al., 2020) that can trap TAG and DAG, according to *in silico* molecular simulations (Prasanna et al., 2021; Zoni et al., 2021). In yeast, Seipin can associate with PEX30, a protein involved in peroxisome biogenesis, thus defining common nucleation sites for LDs and peroxisome (Joshi et al., 2018; Wang et al., 2018). In mammals, Multiple C2 domain containing transmembrane protein 2 (MCTP2) plays a role similar to that of PEX30 (Joshi et al., 2018; Joshi, Ragusa, Prinz, & Cohen, 2021). In addition, Seipin can be recruited by LDAF1/Promethin, thus forming a complex that promotes LD formation; LDAF1/Promethin later dissociates from Seipin and covers the surface of LDs (Castro et al., 2019; Chung et al., 2019). Seipin function



**Fig. 3** TAG biosynthesis in photosynthetic organisms. Triacylglycerols (TAGs) can be generated either *de novo* or through the recycling of other glycerolipids. *De novo* synthesis starts with glycerol-3-phosphate (G3P) and leads to diacylglycerol (DAG) formation after esterification of two fatty acids, respectively, by a Glycerol-3-phosphate acyl-transferase (GPAT) and a lysophosphatidic acid acyl-transferase (LPAAT), and then dephosphorylation by a phosphatidic acid phosphatase (PAP). DAG can also be generated by the recycling of phospholipids, either directly through the action of phospholipase C (PLC), or indirectly through phospholipase D (PLD) which generates PA. Diacylglycerol cholinephosphotransferase (PDCT) transfers the polar head from PC to DAG, thus leading to an exchange of the fatty acids contained in both molecules. Another recycling route involves the transfer of the galactose polar head of monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG) to another galactolipid (xGDG) by a Galactolipid:Galactolipid Galactosyltransferase, thus generating DAG as well as oligogalactolipids ((x+1)GDG)). The last step of TAG synthesis can involve a Diacylglycerol acyl-transferase (DGAT) or a phospholipid:diacylglycerol acyl-transferase (PDAT) that directly transfers a fatty acid from a glycerolipid to DAG thus generating lyso-glycerolipids and TAG. While most PDATs use phospholipids and, in particular, phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE), the one from *Chlamydomonas reinhardtii* (CrPDAT) can also use plastid lipids such as MGDG and sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) (Yoon, Han, Li, Sommerfeld, & Hu, 2012). Extra-plastidial enzymes are represented by black ellipses, and plastidial enzymes by light gray ellipses. DGATs and PDATs can have both localization depending on the considered isoform, organism or physiological state. *Figure based on* Ischebeck, T., Krawczyk, H. E., Mullen, R. T., Dyer, J. M., & Chapman, K. D. (2020). Lipid droplets in plants and algae: distribution, formation, turnover and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.014> and Higashi, Y., & Saito, K. (2019). Lipidomic studies of membrane glycerolipids in plant leaves under heat stress. *Progress in Lipid Research*, 75, 100990. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.100990>.

in LD biogenesis is conserved in plants (Cai et al., 2015) and algae (Lu et al., 2017), although differences are observed. The three Seipin homologs identified in *Arabidopsis thaliana* have overlapping but not redundant functions (Cai et al., 2015; Taurino et al., 2018). Seipin 2 and 3, but not Seipin 1, can associate with the vesicle-associated membrane protein

(VAMP)-associated protein VAP27, an interaction crucial for LD formation (Greer et al., 2020). LDAF1/Promethin homologs, as well as those of FIT2, another important protein in yeast and animals LD biogenesis (Choudhary et al., 2015), have not been identified thus far in plants. However, some specific plant proteins are involved in LD biogenesis such as Lipid Droplet Associated Proteins (LDAPs) (Gidda et al., 2016) and the associated LDAP-interacting protein (LDIP) (Pyc et al., 2017). A recent study has shown that LDIP interacts with Seipin proteins and that this interaction has functional similarities with the Seipin/LDAF1 interaction (Pyc et al., 2021).

The monolayer surrounding LDs likely reflects the membrane composition of the compartment where LD biogenesis occurs. In plants, as well as in non-photosynthetic organisms, it mostly contains phospholipids (Tauchi-Sato, Ozeki, Houjou, Taguchi, & Fujimoto, 2002; Tzen, Cao, Laurent, Ratnayake, & Huang, 1993). However, other classes of lipids have been identified in microalgae. Upon nitrogen starvation, Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) is found in the LDs of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Goold et al., 2016; Tsai et al., 2015) and the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Lupette et al., 2019), along with a betaine lipid, respectively, 1,2-diacylglycerol-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine (DGTS) and 1,2-diacylglycerol-3-O-2'-(hydroxymethyl)-(N,N,N-trimethyl)- $\beta$ -alanine (DGTA). Mono- and digalactosylglycerol (MGDG and DGDG) are also found in the LD monolayer of *Chlamydomonas*, especially when algae are submitted to high light stress (Goold et al., 2016). The simultaneous presence of ER lipids (betaine and phospholipids) and plastid lipids (SQDG, MGDG and DGDG) underlines a possible cooperation between the ER and plastid for LD biogenesis in microalgae. Electronic microscopy observations (Flori, Jouneau, Finazzi, Marechal, & Falconet, 2016; Goodson, Roth, Wang, & Goodenough, 2011; Jaussaud et al., 2020; Lupette et al., 2019) comfort this hypothesis, showing tight associations between the plastid and LDs. Interestingly, the role of the chloroplast in LD biogenesis could be conserved in the green tissues of higher plants. Indeed, older studies have shown an association of DGAT with chloroplast envelopes in spinach and *Arabidopsis* leaves (Kaup, Froese, & Thompson, 2002; Martin & Wilson, 1984), while contacts between LDs and chloroplasts were observed by electron microscopy in aging leaves (Brocard et al., 2017).

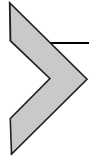
Altogether, the specificities of the proteins involved in LD biogenesis, as well as the increasingly obvious involvement of plastids, underline the

interest in further exploring this process in plants, as well as in microalgae where the diversity of the plastid origins and architectures (cf. Fig. 1) raises even more questions.

## 2.2 Lipid droplet associated proteins

Proteins are essential components of LDs and can be associated with LDs in different ways. Class I proteins are transferred from the ER to the LD and contain a hydrophobic domain forming a hairpin that anchors the protein in the LD. Class II proteins are transferred to the LD surface from the cytosol. Some contain an amphipathic helix that associates with the LD surface while others interact more loosely with LDs through association either with other LD proteins or following post-translational modifications that add a lipid anchor, such as farnesyl groups (Bersuker & Olzmann, 2017; Dhiman, Caesar, Thiam, & Schrul, 2020; Olzmann & Carvalho, 2019) (Fig. 2A). The most abundant proteins at the surface of LDs are often structural proteins, although they can have other functions as will be exposed later in the review. Land plants have four major families of LD proteins, with different tissue specificities and different associated roles (Huang, 2018) (Fig. 2C). Oleosins (Huang, 1992) are the major LD proteins in plant seeds and pollen, but are absent from leaves LDs, which are instead covered with LDAPs (Gidda et al., 2016; Horn et al., 2013). Oleosins are involved in the regulation of LD size, but also in TAG biosynthesis (Parthibane, Rajakumari, Venkateshwari, Iyappan, & Rajasekharan, 2012). The other two families, Caleosins (Næsted et al., 2000), and Stereoleosins (Lin, Tai, Peng, & Tzen, 2002), are found in all plant tissues. Oleosins, caleosins and LDAPs homologs could be identified in green algae (Huang, 2018), but the most abundant LD protein in *Chlamydomonas reinhardtii* is the Major Lipid Droplet Protein (Moellering & Benning, 2010; Nguyen et al., 2011). Finally, the major LD proteins in secondary endosymbionts show little conservation: in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, the most abundant LD protein is Stramenopile Lipid Droplet Protein (StLDP) (Yoneda, Yoshida, Suzuki, & Watanabe, 2016), while it is the Lipid Droplet Surface Protein in other stramenopiles belonging to the *Nannochloropsis* and *Microchloropsis* genera (Vieler, Brubaker, Vick, & Benning, 2012). However, another abundant LD protein in *Phaeodactylum* called PtLDP1 (Lipid Droplet Protein 1) (Wang et al., 2017) is highly similar to the DOAP1 protein (diatom oleosome-associated protein 1) from another diatom, *Fistulifera* sp. (Guéguen et al., 2021; Nojima et al., 2013) (Fig. 2B).

Thus, major LD proteins show specificities depending on the considered organism or tissue. Yet, it only gives a glimpse into the proteomic variety found in LDs, which in turns reflects the many roles of this fascinating compartment. Indeed, while energy storage has been the first identified role of LDs, many more have since emerged.



### **3. Functions for lipid droplets in normal conditions and abiotic stress**

#### **3.1 Lipid droplets as a source of carbon**

In plant seeds, TAGs stored in LDs constitute a reservoir of energy and carbon skeletons to sustain germination and post-germination growth, when the plantlet cannot depend on photosynthesis (Graham, 2008; Huang, 1992). While energy storage can rely on other molecules, in particular proteins and starch, TAGs are widely used and can be stored in the embryo itself or in the endosperm (Miray, Kazaz, To, & Baud, 2021). However, we will not distinguish here between the different tissues that compose the seed. LD mobilization can occur in two ways: lipophagy, a specialized form of autophagy, and lipolysis. A recent study has shown that lipophagy plays a role in LD breakdown during seed germination and post-germination growth in *Ricinus communis* (Han et al., 2020). Yet, whether this is specific to certain species or a more general pathway remains to be determined. The most important LD degradation pathway in seeds is lipolysis (Graham, 2008). It starts by the degradation of Oleosins covering seed LDs by the 26S proteasome (Deruyffelaere et al., 2015, 2018; Kretzschmar et al., 2018). Then, the TAG lipases SUGAR-DEPENDENT1 (SDP1) and SUGAR-DEPENDENT1-LIKE (SDP1L) (Eastmond, 2006; Kelly, Quettier, Shaw, & Eastmond, 2011) catalyze the first step of TAG hydrolysis that ultimately leads to the release of glycerol and free fatty acids. The control of seed LD size, which is dependent on Oleosins (Shimada, Shimada, Takahashi, Fukao, & Hara-Nishimura, 2008; Siloto et al., 2006), is crucial to ensure lipolysis efficiency (Shimada et al., 2008). Indeed, smaller LDs have a higher surface/volume ratio that facilitates their degradation. Fatty acids can then be converted to acetyl-CoA by  $\beta$ -oxidation (Goepfert & Poirier, 2007) in specialized peroxisomes called glyoxysomes (Beever, 1979), and used for gluconeogenesis (Goepfert & Poirier, 2007; Hayashi & Nishimura, 2003; Miray et al., 2021; Quettier, Shaw, & Eastmond, 2008). In most albuminous seeds, the TAGs stored in the

endosperm are thus converted to sucrose before being transported to the seedling itself (Miray et al., 2021). Alternatively, fatty acids can be reused to build new membrane lipids.

Similarly to what occurs in seeds, the formation of LDs is essential for pollen development as disruption of TAG synthesis leads to pollen abortion (Zhang, Fan, Taylor, & Ohlrogge, 2010). Studies on olive pollen have shown that LD mobilization provides energy for pollen germination (Zienkiewicz, Zienkiewicz, Rejón, Rodríguez-García, & Castro, 2013). Moreover, impairment of fatty acid transport to peroxisome (Footitt et al., 2007), disruption of the TAG lipase OBL1 (Oil body lipase 1) (Muller & Ischebeck, 2018) as well as enlargement of LDs caused by disruption of the three SEIPINs (Taurino et al., 2018), reduce male fertility. However, the amount of TAGs in LDs is likely insufficient to store enough energy and lipid precursors to sustain the pollen tube growth. Moreover, there is a continuous synthesis of TAGs in this organ, raising the hypothesis that LD essential role lies elsewhere (Ischebeck, 2016; Ischebeck et al., 2020).

In microalgae, LDs accumulate mainly in response to abiotic stress, in particular deprivation of nutrients, which induces growth arrest. While the photosynthetic apparatus and chloroplast lipids eventually get partially degraded, photosynthesis remains active (Abida et al., 2015; Simionato et al., 2013). In this situation, LDs allow the storage of the excess carbon produced, and provide energy and carbon to quickly restart when the conditions get better. In agreement with this, nitrogen resupply following nitrogen starvation leads to a very rapid degradation of TAGs, as well as other storage components such as starch (Mulders, Lamers, Wijffels, & Martens, 2015; Tsai, Uygun, Roston, Shiu, & Benning, 2018).

### 3.2 Lipid droplets, lipid synthesis and lipid remodeling

The function of LDs in lipid membrane remodeling and homeostasis has been well described in yeast (Graef, 2018; Henne, Goodman, & Hariri, 2020). Indeed, in *Saccharomyces cerevisiae*, the KO of the four genes involved in TAG (the *DGAT* ortholog *Dga1p* and the *PDAT* ortholog *Lro1*), and SE (the *acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase* orthologs *Are1p* and *Are2p*) synthesis severely impairs the yeast ability to respond to stress. Exposure of these mutants to unsaturated free fatty acids (FFA), which are normally taken in and incorporated into TAGs, leads to aberrant membrane formation and ultimately to cell death, suggesting that LD storage of TAGs and SEs acts

as a buffer to protect the cell against toxic FFA (Petschnigg et al., 2009). Moreover, growth of these mutants at high temperature in the absence of Inositol leads to severe growth defects and the authors observed a decreased synthesis of membrane phospholipids even in normal growing conditions, suggesting a coordination of membrane lipids and storage lipid syntheses to maintain lipid homeostasis (Gaspar, Hofbauer, Kohlwein, & Henry, 2011). In agreement with this idea, a more recent study has shown that LD formation and subsequent degradation by microautophagy are crucial for adaptation of yeast cells to lipid imbalance (Vevea et al., 2015). The quadruple TAG/SE synthesis mutants also show macroautophagy defects. This may be linked to general ER homeostasis defects or failure to supply the FA necessary for autophagosome formation (Henne et al., 2020; Velázquez, Tatsuta, Ghillebert, Drescher, & Graef, 2016), as it is the case for prospore membrane building during sporulation (Hsu, Chen, Cheng, & Wang, 2017). Finally, a recent study has shown an important function for *Lro1*, the yeast homolog of *PDAT*, in the homeostasis of the nuclear envelope and localization of the nucleolus during the cell cycle or in response to stress (Barbosa et al., 2019).

### 3.2.1 Lipid droplets, lipid synthesis and remodeling in microalgae

LD proteomes from green microalgae such as *Chlamydomonas reinhardtii* (Goold et al., 2016; Moellering & Benning, 2010; Nguyen et al., 2011; Tsai et al., 2015), as well as from secondary endosymbionts such as *Phaeodactylum tricornutum* (Leyland, Zarka, Didi-Cohen, Boussiba, & Khozin-Goldberg, 2020; Lupette et al., 2019) have shown that their LDs contain high amounts of proteins involved in lipid synthesis. Most can be directly related to TAG biosynthesis (such as enzymes involved in FA synthesis, GPATs, LPATs and DGATs, see Fig. 3), while others are involved in different lipid synthesis pathways. Interestingly, the DGTS synthase BTA1 has been identified in the LD proteomes of the green algae *Dunaliella bardawil* (Davidi, Levin, Ben-Dor, & Pick, 2015), *Chromochloris zofingiensis* (Wang, Wei, Mao, & Liu, 2019) and *Chlamydomonas reinhardtii*, in which it is one of the most abundant proteins (Goold et al., 2016; Nguyen et al., 2011; Tsai et al., 2015). It has been proposed that LD-resident BTA1 synthesizes the DGTS that surrounds *Chlamydomonas* LDs (Goold et al., 2016; Nguyen et al., 2011). However, while DGTA is found in the monolayer surrounding *Phaeodactylum* LDs (Lupette et al., 2019) the putative DGTA synthase has not been identified in the corresponding LD proteomes (Leyland, Zarka, et al., 2020; Lupette et al., 2019). This could be explained by differences

in experimentation time-courses, as LD proteomes from green algae were determined after 24–48 h of nitrogen starvation while those of *Phaeodactylum* were established after 7 days. However, the different growth rates of these different algae make the comparison difficult. Alternatively, it could reflect metabolic differences between the considered organisms; DGTA is only a minor lipid in *Phaeodactylum*, while DGTS is major in *Chlamydomonas* where it replaces Phosphatidylcholine (PC).

Several proteins involved in sterol biosynthesis have also been identified in many LD proteomes. This is the case after nitrogen starvation in the previously cited green algae (Davidi et al., 2015; Goold et al., 2016; Nguyen et al., 2011; Tsai et al., 2015; Wang et al., 2019) and in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Leyland, Zarka, et al., 2020), as well as in *Chlamydomonas* after exposure to high light. One of these proteins, the Sterol methyl-transferase 1, has also been identified in the proteome of *Nicotiana benthamiana* pollen tube LDs, along with cycloartenol synthase, another enzyme of sterol metabolism (Kretzschmar et al., 2018). Interestingly, a function of LDs in sterol metabolism has been shown in yeast (Sorger, Athenstaedt, Hrastnik, & Daum, 2004), but whether a similar function exists in algae or plants remains unknown.

Altogether, the presence of proteins involved in different lipid synthesis pathways in several independent LD proteomes raises questions as to potential roles of LDs in coordinating lipid production pathways in the considered organisms/organs.

In addition to proteins involved in lipid synthesis, proteins involved in membrane remodeling and lipid trafficking have also been found in the previously cited proteomes as well as in another diatom, *Fistulifera solaris* (Nonoyama et al., 2019), along with cytoskeleton and intracellular vesicle trafficking proteins. Several studies have pointed out the function of LDs in lipid remodeling. In the absence of stress, TAG synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* is mainly dependent on PDAT. This enzyme (CrPDAT) can not only use phospholipids but also the plastid lipids MGDG, DGDG and SQDG as fatty acid donors (cf. Fig. 2). Moreover, reduction of CrPDAT levels results in a slightly slower growth, suggesting that lipid remodeling by this pathway is important for the cell fitness (Yoon et al., 2012). While this study shows that CrPDAT contribution is less important in stress conditions, degradation of glycerolipids is still important to feed TAGs under such situations. The disruption of the lipase PLASTID GALACTOGLYCEROLIPID DEGRADATION1 (PGD1), which hydrolyses MGDG, reduced TAG accumulation under nitrogen



starvation (Li, Moellering, et al., 2012), while other classes of glycerolipids are converted to TAGs under heat stress (Légeret et al., 2016). This recycling of glycerolipids to TAGs is likely conserved as high levels of very long-chain unsaturated fatty acids are found in TAGs in Stramenopiles (reviewed in Guéguen et al., 2021) as well as in the Haptophyte *Tisochrysis lutea* (Huang et al., 2019) following nitrogen or phosphate deprivation. Finally, study of the green microalga *Parachlorella kessleri* under salt stress has shown that LDs accumulate at the cell periphery and likely contribute to remodeling the FA composition of the plasmid membrane lipids to modify its permeability (You, Zhang, Peng, & Miao, 2019).

### **3.2.2 Lipid droplets and lipid remodeling in the pollen tube**

In higher plants, lipid trafficking appears as a major function during pollen formation and later during pollen tube growth. Sporopollenin, a very resistant polymer that covers pollen, is synthesized and deposited from a specific tissue localized in the anther and called the tapetum. Tapetum cells form specific LDs associated with ER membranes, named tapetosomes, as well as specialized plastids filled with plastoglobuli, called elaioplasts. Upon programmed cell death, tapetal cells release the lipids contained in those structures that contribute to the formation of the pollen coat (reviewed by Ischebeck, 2016). Pollen germination and pollen tube growth require LD mobility. Indeed, in olive pollen after germination LDs are no more found in the grain, but many are present in the pollen tube (Zienkiewicz et al., 2010). This change of localization is hindered by the enlarged size of LDs in triple Seipin mutants of *Arabidopsis*, and leads to male fertility defects (Taurino et al., 2018). The continuous TAG synthesis during pollen tube growth is at least partly fed by the recycling of phospholipids. Indeed, mutants deficient for the non-specific phospholipases C2 and C6 (Bose, Ngo, Nguyen, & Nakamura, 2021) as well as for DGAT1 and PDAT1 (Bose et al., 2021; Zhang et al., 2010) (cf. Fig. 2) show reduced TAG synthesis. In his 2016 review, Ischebeck proposed several interesting hypotheses as to the function of LDs in pollen tube, including the involvement of LDs in lipid transport, regulation of lipid synthesis, acyl-editing or adaptation to environmental changes occurring during the pollen tube growth (Ischebeck, 2016). These functions have been known in other organisms for some time, in particular mammals (Murphy, 2012), and may not be restricted to the pollen tube.

### 3.2.3 Lipid droplets and lipid remodeling in leaves

In higher plants, TAGs represent a very low percentage of glycerolipids in healthy leaves and very few LDs are observed. However, disruption of TAG degradation leads to ectopic accumulation of LDs in the leaves (James et al., 2010), suggesting that TAG are constantly synthesized and degraded in this tissue. Later studies have shown that LD abundance varies with the diurnal cycle, and that LDs are the most abundant at the end of the night phase (Gidda et al., 2016). As FA synthesis is promoted by photosynthesis, it seems unlikely that these TAG are synthesized *de novo* and more likely that they derive from recycling of membrane lipids. Mechanisms explaining TAG function in lipid homeostasis and remodeling in higher plants have been proposed in a recent review (Yu, Zhou, Fan, Shanklin, & Xu, 2021). Indeed, the *Arabidopsis* genome encodes three different DGATs and two PDATs with different substrate specificities in terms of acyl chain length and insaturation levels. Therefore, expression levels of the various DGATs may affect the acyl-CoA pool available for other lipid productions, while expression levels of the PDATs may promote recycling of certain PC species, thus modifying membrane compositions. As TAG storage organelles, LDs could just serve as a transitory sink or help to preserve certain fatty acids that are costly to produce or that can be used in case of rapidly changing conditions. Interestingly, a recent paper has enlightened the important role of autophagy for TAG formation and membrane lipid turnover in mature and senescent leaves, highlighting a possible role of LDs for the degradation of damaged organelles and recycling of their lipid contents (Fan, Yu, & Xu, 2019).

Indeed, LD formation in leaves is mainly triggered by senescence and abiotic stresses. During senescence, the degradation of membrane lipids and subsequent formation of TAGs may allow the redistribution of FA to other tissues. Consistently, the proteome of LDs in senescent leaves contains several cytoskeleton proteins as well as proteins involved in lipid but also protein transports (Brocard et al., 2017). In addition to the formation of LDs, abiotic stresses trigger changes in the fatty acid composition of glycerolipids, in particular of the plastid lipids MGDG and DGDG, and of PC. These changes vary depending on the type of stress, as does TAG composition (reviewed in Higashi & Saito, 2019). Heat, drought and salt stress can induce a very rapid TAG accumulation, in contrast to cold, high light or osmotic stress that require a longer exposure (Mueller, Krause, Mueller, & Fekete, 2015). The response to heat stress has been extensively studied and shows that TAG generation comes from the recycling of other

lipids rather than from *de novo* synthesis (Higashi & Saito, 2019). Indeed, transcriptomic data indicate a decrease of fatty acid and chloroplast glycerolipid syntheses (Higashi, Okazaki, Myouga, Shinozaki, & Saito, 2015), while the generated TAGs contain high levels of unsaturated fatty acids, in particular C18:3 and C16:3 (Higashi et al., 2015; Mueller et al., 2015). Analysis of fatty acid desaturation mutants shows that these unsaturated fatty acids are likely recycled from MGDG (Mueller, Unger, Guender, Fekete, & Mueller, 2017), after the initial removal of C18:3 from MGDG by the Heat-Inducible Lipase 1 (HIL1) (Higashi et al., 2018). The analysis of several TAG synthesis mutants has shown that PDAT1, but not DGAT1, is the major actor in TAG biosynthesis upon heat stress (Mueller et al., 2017). Finally, the thermosensitivity observed in *pdat1* and *hil1* mutants enlightens the importance of MGDG remodeling and of TAG synthesis in this process (Higashi et al., 2018; Mueller et al., 2017). MGDG remodeling also appears essential in tolerance to freezing, albeit for different reasons. Indeed, Moellering and collaborators have identified Sensitive-to-Freezing2 (SFR2) as a galactolipid:galactolipid galactosyltransferase that can transfer galactose from MGDG to another galactolipid, thus depleting the MGDG pool and forming oligogalactolipids and DAGs, the latter being converted into TAGs (cf. Fig. 3). The authors hypothesized that this reduction of MGDG and consequent increase in DGDG and other oligogalactolipids serve to stabilize membranes following freezing-induced desiccation (Moellering, Muthan, & Benning, 2010). Consistently, similar changes in galactolipids and TAGs were observed upon drought (Gasulla et al., 2013; Tarazona, Feussner, & Feussner, 2015) and cold (Degenkolbe et al., 2012; Tarazona et al., 2015) stresses, and SFR2 was also associated with resistance to salt and drought stresses in tomato (Wang, Hersh, & Benning, 2016). More recent studies have shown that in contrast to heat stress, DGAT1 is the essential player in TAG formation upon freezing and is important for freezing tolerance (Arisz et al., 2018; Tan et al., 2018).

### 3.3 Lipid droplets and cell protection

In addition to their role in membrane lipid remodeling and transitory storage of fatty acids during stress conditions, leaf LDs appear essential to cell protection. Indeed, free fatty acids, as well as glycerolipids that cannot assemble into membranes such as PA or DAG, can be toxic for the cell by disorganizing the complex intracellular membrane network (Li et al., 2020;

Petschnigg et al., 2009). Storage into TAG serves as a transient but essential sink before degradation (Fan, Yan, Roston, Shanklin, & Xu, 2014; Fan, Yu, & Xu, 2017).

In addition to TAG and sterol esters, LDs can store other hydrophobic compounds such as carotenoids. In the marine green algae *Dunaliella bardawil* and *salina*, carotenoids are stored in plastoglobuli, while in freshwater green algae such as *Haematococcus pluvialis*, carotenoids are found in cytosolic LDs. In both cases, carotenoid production is induced by reactive oxygen species (ROS) that are generated following stress such as high light or nutrient deprivation, and they can serve both to protect the photosynthetic system against photodamage created by excessive irradiation and to quench the effect of ROS (review Pick, Zarka, Boussiba, & Davidi, 2019). Carotenoids have also been found in *Phaeodactylum* LDs but whether they are stored in cytosolic LDs or plastoglobuli is not clear (Lupette et al., 2019).

Finally, several proteins of the ER associated protein degradation (ERAD) pathway, which serve to remove misfolded proteins and target them for degradation by the 26S-proteasome, have been identified in LD proteomes of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* after 7 days of nitrogen deprivation (Leyland, Zarka, et al., 2020; Lupette et al., 2019) as well as in *Arabidopsis* seeds (Deruyffelaere et al., 2018; Kretzschmar et al., 2018), senescent leaves (Fernandez-Santos et al., 2020) and *Nicotiana* pollen (Kretzschmar et al., 2018). Their function in *Arabidopsis* seeds seems to be mainly the degradation of Oleosins and Caleosins preceding the remobilization of oil reserves upon germination (Deruyffelaere et al., 2015, 2018). However, many additional proteins associated with the regulation of protein folding and ubiquitinylation have been identified in LDs from pollen tubes, leaves and *Phaeodactylum*, suggesting a broader function of lipid droplets in protein processing and catabolism.

### 3.4 Lipid droplets, a reserve to restart

In addition to proteins associated with lipid metabolism or LD structure, which are expected to be present, more unexpected proteins are found in LDs. In many cases, they are assumed to result from contaminations, and, as such, are little discussed in the literature. Yet, there are lines of evidence suggesting that they should be considered with more attention.

Many of the microalgae LD proteomes performed under nutrient starvation conditions include proteins linked to DNA organization (histones), and regulation of protein translation (ribosomal proteins, translation

elongation factors) (Davidi et al., 2015; Goold et al., 2016; Leyland, Zarka, et al., 2020; Lupette et al., 2019; Moellering & Benning, 2010; Nguyen et al., 2011; Tsai et al., 2015; You et al., 2019). Interestingly, these are generally not found in higher plant seed proteomes.

Upon nutrient starvation, LDs can include all histones or a subset of histones, including core histones (H2A, H2B, H3 and H4), histone variants, as well as the linker histone H1. While histones are abundant proteins, they are mostly contained in the nucleus and are highly hydrophilic proteins, suggesting that their association with LDs in stressed microalgae is unlikely to result from contamination. The association of histones to LDs has been described in the model fly *Drosophila melanogaster*, where LDs serve as histone storage (Cermelli, Guo, Gross, & Welte, 2006) and regulate histone supply during the early phases of embryonic development (Li, Thiel, et al., 2012). As nutrient starvation severely impairs microalgae growth, it could be speculated that LDs, similarly to what occurs in *Drosophila*, could serve as a histone deposit during stress, when cell growth is severely impaired, to favor quick restart once the conditions become more favorable. The storage of ribosomal proteins and translation elongation factors could serve the same purpose. Ribosomal proteins are among the most abundant proteins in the cell and their presence in LD proteomes has long been considered as contaminations. Yet, similarly to histones, they are not found in plant seeds proteomes. Moreover, proteins associated with translation processes are the most strongly down-regulated upon nitrogen and phosphorus starvation (Hulatt et al., 2020), and storage in LDs could serve to preserve a minimal pool from degradation. In support of this possible role for LDs, neither histones nor translation-associated proteins are found in the LD proteome of *Chlamydomonas* grown under high light, a condition that triggers LD accumulation but not cell growth arrest (Goold et al., 2016).

Finally, some RNA-binding proteins have been identified in several microalgae proteomes (Lupette et al., 2019; Moellering & Benning, 2010; Nguyen et al., 2011; Wang et al., 2019), raising the possibility that LDs could serve to preserve a RNA pool.

### 3.5 Lipid droplets and brassinosteroid signaling

Together with Oleosins and Caleosins, Steroleosins are one of the main families of proteins associated with LDs in plants (Fig. 2C). They may be associated with the synthesis of brassinosteroids, which are plant hormones involved in different developmental processes as well as resistance to biotic

and abiotic stresses (Divi & Krishna, 2009; Singh & Savaldi-Goldstein, 2015). The first two steroleosins have been identified in *Sesamum indicum* (Chen, Tai, Peng, & Tzen, 1998), and the first identified *Arabidopsis* homolog possesses 11 $\beta$ - and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities and was thus renamed HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE 1 (AtHSD1) (d'Andréa et al., 2007). Initial studies have shown that over-expression of AtHSD1 leads to reduced seed dormancy (Baud et al., 2009; Li, Asami, Wu, Tsang, & Cutler, 2007) as well as to increased growth and resistance to salt stress (Li et al., 2007). How the association of AtHSD1 to LDs modulates its function and contributes to brassinosteroid signaling remain open questions.



## 4. LD and biotic stress

Interactions between LDs and pathogens have been mostly studied in mammalian cells, where studies highlighted two antagonist roles for LDs: they can either be used by the pathogen or participate in cell and organism defense.

### 4.1 Hijacking of the host metabolism

The current state of the art suggests that mammalian LDs can participate in the infection process, providing invaders with substrates for survival and/or growth (Bosch et al., 2020). This phenomenon is described as the “hijacking” of the host metabolism. Bacteria such as *Chlamydia trachomatis* (Kumar, Cocchiario, & Valdivia, 2006), eukaryotic parasites such as *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* (Hu, Binns, & Reese, 2017), or even viruses such as Hepatitis C Virus (Herker et al., 2010; Miyanari et al., 2007) and Sars-Cov2 (Dias et al., 2020), can induce the accumulation of LDs in the host and use it as a lipid source. During viral infection, this hijacking can go even further. For example, the Hepatitis C Virus (HCV) targets the liver, where LDs are consumed for the production and assembly of new infectious virus particles. In a model proposed by Miyanari et al., the core HCV protein binds to the lipid monolayer surrounding the LD, brings ER membranes close to the LD and recruits virus proteins as well as replication complexes to this microenvironment in order to produce new viral particles (Miyanari et al., 2007).

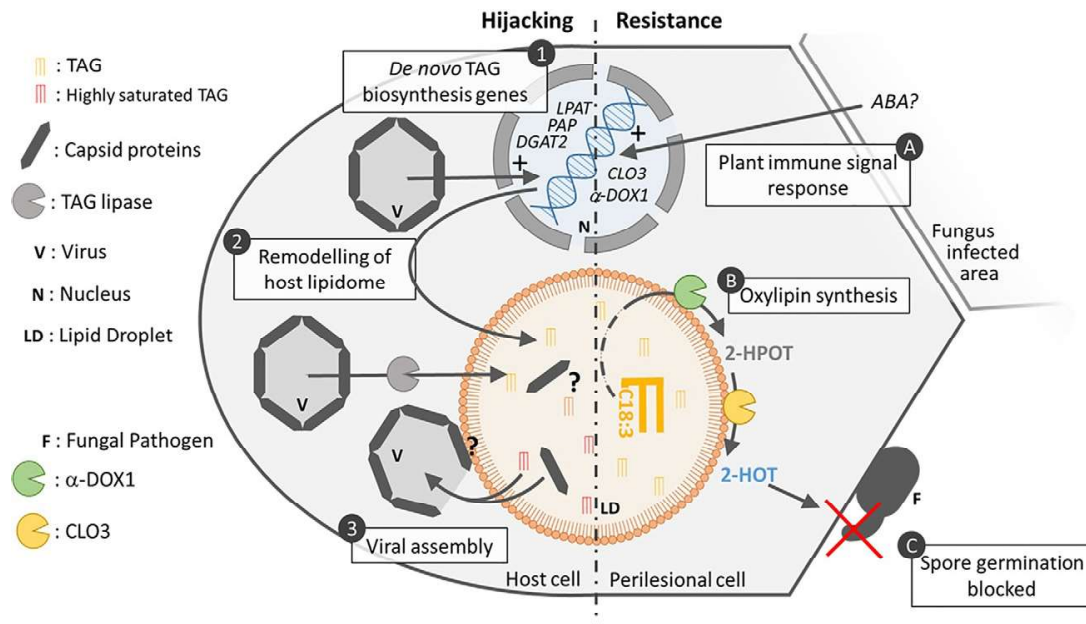
Interestingly, this hijacking of the host metabolism by pathogens also occurs in viral infection of eukaryotic microalgae. Due to high ecological relevance, several studies have taken interest in the infection of

Haptophytes, and in particular of the coccolithophore *Emiliana Huxleyi*, by large dsDNA viruses. An initial study showed that infection of *Emiliana* by the lytic virus EhV201, belonging to the Phycodnaviridae, leads to a complete rewiring of the host lipidome (Rosenwasser et al., 2014). An increase in *de novo* fatty acid synthesis proved crucial for viral production. Indeed, lipid biosynthesis reoriented to favor the production of specific glycosphingolipids at the expense of host sphingolipids. These virus-derived glycosphingolipids (vGSL) are central structural components of the virus membrane and can trigger programmed cell death of infected cell (Vardi et al., 2009). Finally, sterols appeared depleted in the host, feeding the new virions (Rosenwasser et al., 2014). Malitsky et al. (2016) completed this study and showed that Ehv201 can induce specific TAG accumulation and LD formation by upregulating genes involved in *de novo* TAG synthesis (LPAT, PAP, DGAT2) and downregulating genes involved in TAG recycling from phospholipids (such as PDAT). Virus-induced TAG, characterized by a high enrichment in unsaturated and monounsaturated fatty acids, are later found in high amounts in the virions. All those results led the authors to speculate that virus-induced LDs play a crucial role in virus assembly (Malitsky et al., 2016) (Fig. 4, left panel) as has been described for HCV (Miyanari et al., 2007). Other virus families may share this mechanism. Indeed, a recent study showed that the giant haptophyte-infecting virus, *Prymnesium kappa* virus RF01 (PkV RF01) belonging to the Mimiviridae family, encodes many proteins involved in lipid catabolism, among which a TAG lipase and other key enzymes of the  $\beta$ -oxidation pathway. This suggests that this virus is also capable to break down host LDs for its propagation (Blanc-Mathieu et al., 2021).

## 4.2 Lipid droplets as defense organelles

While this LD hijacking by pathogens may paint LDs as weak points in the cell, their active role in innate defense have been equally reviewed (Pereira-Dutra, Teixeira, de Costa, & Bozza, 2019). Indeed, in mammals, proteins with anti-pathogen properties such as viperin (Hinson & Cresswell, 2009) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) inducible guanosine triphosphatase (GTPase) (IGTP; Bougnères et al., 2009; Haldar et al., 2013) are localized in the LDs of infected cells, and similar roles of LDs have been shown in higher plants.

Several studies regarding LDs in *Arabidopsis thaliana* leaves highlight their function in defense against various pathogens (Brocard et al., 2017;



**Fig. 4** Functions of LDs in pathogen response: two examples. Left panel: Hijacking of the host LD for the benefit of the pathogen: infection of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* by the lytic *Emiliana huxleyi* virus (EhV201). At 24h post infection, the expression of genes involved in *de novo* TAG biosynthesis such as *LPAT*, *PAP* and *DGAT2* is upregulated (1). This results in the remodeling of the host lipidome and the formation of lipid droplets (2), which could be associated with the storage of viral capsid proteins. The TAGs become progressively more saturated. In the later stage of the infection, high expression of virus-encoded lipases may lead to the disruption of the LD, and the formation of a new viral particle containing a high amount of highly saturated TAGs (3). Right panel: LD as a production platform for phytoalexins. Response of *Arabidopsis thaliana* leaves to fungi infection. Upon infection by fungi such as *Colletotrichum higginsianum*, the expression of Caleosin3 (CLO3) and α-Dioxygenase 1 (αDOX1) is induced in perilesional cells, possibly through the action of abscisic acid (ABA), an essential hormone involved in the plant immune response (A). α-DOX1 and CLO3 locate to the leaf LD and cooperatively produce the oxylipin 2-hydroxyoctadecatrienoic acid (2-HOT) from α-linolenic acid (C18:3, ω-3) (B). 2-HOT blocks the fungi (F) spore germination and its propagation to healthy tissues (C). A similar defense system is induced by senescence. *Left panel: model based on Malitsky, S., Ziv, C., Rosenwasser, S., Zheng, S., Schatz, D., Porat, Z., et al. (2016). Viral infection of the marine alga *Emiliana huxleyi* triggers lipidome remodeling and induces the production of highly saturated triacylglycerol. New Phytologist, 210(1), 88–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.13852> and inspired by Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., et al. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nature Cell Biology, 9(9), 1089–1097. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ncb1631> Right panel: based on Shimada, T. L., Takano, Y., Shimada, T., Fujiwara, M., Fukao, Y., Mori, M., et al. (2014). Leaf oil body functions as a subcellular factory for the production of a phytoalexin in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 164(1), 105–118. <https://doi.org/10.1104/pp.113.230185>.*



Fernandez-Santos et al., 2020; Shimada, Hayashi, & Hara-Nishimura, 2018; Shimada et al., 2014). Indeed, proteomics have shown that several enzymes involved in production of phytoalexins, compounds that participate in plant defense, are located in LDs. The most prominent example is that of Caleosins (CLO), which are structural components of plant LDs and exhibit a peroxygenase activity. CLO3, which is also known as Responsive to Dehydration20 (RD20) can be induced by abiotic stresses, notably drought (Aubert et al., 2010) or salt, but also in response to the pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum* (Shimada et al., 2014). Upon infection, the authors have shown that CLO3 colocalizes with  $\alpha$ -Dioxygenase 1 ( $\alpha$ DOX1) on LDs of perilesional cells of the infected leaf, where they coordinately use  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3,  $\omega$ -3) to produce the antifungal oxylipin 2-hydroxy-octadecatrienoic acid (2-HOT). A similar effect is triggered by senescence and the authors propose that phytoalexin-producing LDs that develop in dying cells of perilesional tissues or senescent leaves could serve to form a shield in order to protect the young healthy parts of the plant from infection (Shimada et al., 2014) (Fig. 4, right panel). A recent proteomics analysis comparing LDs from leaves infected by the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (*Pst*) with senescent leaves has shown that they both contain enzymes involved in the biosynthesis of the antimicrobial compound camalexin, as well as GPAT4 and GPAT8, which are implicated in cutin biosynthesis (Fernandez-Santos et al., 2020). The overlap between LD proteomes in these two conditions confirms that they likely share common functions in cell defense against pathogens. Finally, the ectopic expression of stilbene synthases from *Vitis pseudoreticulata* (VpSTS29) in *Arabidopsis* shows that these enzymes, which play a critical role in powdery mildew resistance, can relocate from the cytoplasm to cytosolic LDs upon dark-induced senescence (Ma, Wang, & Wang, 2018). Intriguingly, stilbene synthase-containing LDs can be found both in the cytoplasm and in the vacuole, where stilbenes seem to be stored, thus implying a trafficking role for LDs, an hypothesis supported by the association of many cytoskeleton proteins with LDs (Brocard et al., 2017; Fernandez-Santos et al., 2020). Finally, AtCPK1, which is a Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinase involved in the response to fungal pathogens through the salicylic acid-mediated defense pathway, shows a dual localization to peroxisomes and LDs (Coca & Segundo, 2010). However, the function of this localization remains unknown.

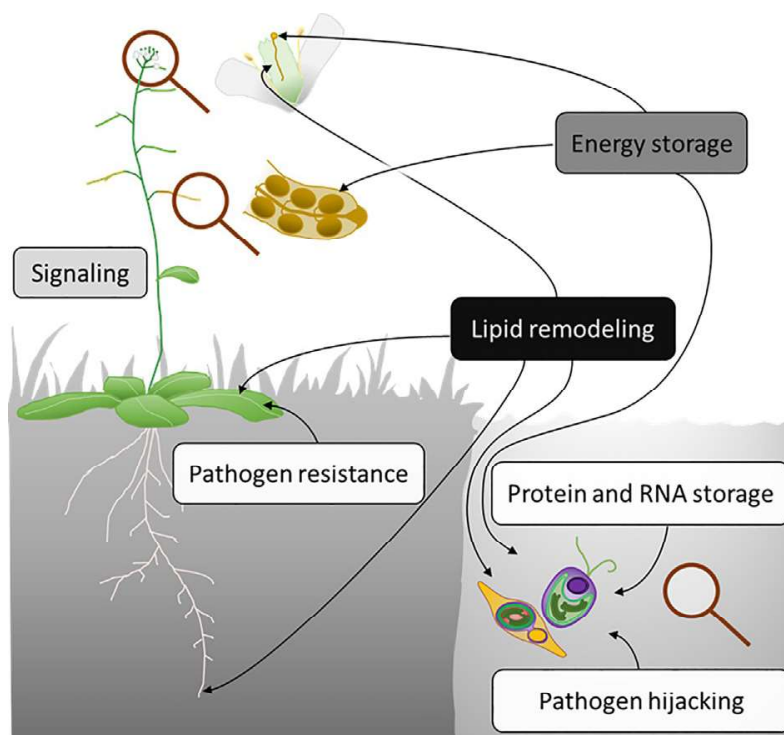
Altogether, these results suggest that LDs of higher plants can be seen as production platforms for anti-pathogenic compounds involved in various

plant defense mechanisms. However, we could not find in the literature any evidence that LDs play such a role in microalgae. The only potential link identified thus far lies in the antibacterial function of Eicosapentaenoic acid (EPA), a very long chain polyunsaturated fatty acid (VLC-PUFA) that is very abundant in many microalgae (Desbois, Mearns-Spragg, & Smith, 2009). However, VLC-PUFA are generally not very abundant in TAGs, and potential anti-pathogenic activities of LDs remain to be investigated in these organisms. This difference of functions, if it exists, may be linked with the multicellular nature of higher plants where an infected part of the plant can signal the danger to the rest of the organism and trigger defenses. It would be therefore very interesting to investigate whether similar signals could exist at the population scale in microalgae. Conversely, the hijacking of LDs has not yet been evidenced in plants even though it exists in multicellular organisms such as mammals. The function of LDs in defense against pathogens in plants and algae thus retains many mysteries to unravel.



## 5. Conclusion

In this review, we have explored the many roles of LDs, far from the simple fat stock that they initially represented (Fig. 5). It is not clear whether the same LD carries all functions or if a cell contains different types of LDs with distinct functions. Several lines of evidence suggest the latter. Analysis of LDs subpopulation in *Phaeodactylum* during nitrogen starvation has shown that there are three waves of LD formation and that these exhibit different behaviors (Jaussaud et al., 2020). The coexistence of several LDs populations with distinct functions has also been suggested in *Arabidopsis* aging leaves (Brocard et al., 2017). Finally, a refined analysis of LDs at different stages of seed formation, germination and seedling development has shown many changes in their proteome, which may reflect different subsets of LDs (Kretzschmar et al., 2020). Our understanding of LD biogenesis as well as of their functions comes mostly from the study of non photosynthetic organisms, animals and yeast. Yet, while there are many common points, evidences show that this knowledge cannot be simply extrapolated to photosynthetic organisms. The primary characteristic of plants and algae is the presence of a photosynthetic plastid that is central in the overall metabolism and in particular in the metabolism of lipids. Moreover, the evolutionary origin of this plastid can considerably diverge when we start looking at secondary endosymbionts, and its role in LD biogenesis requires further



**Fig. 5** The many functions of LDs. LDs have been studied in different organs from land plants, mainly seeds, pollen, leaves and to a lesser extent roots. They were also studied in different microalgae resulting from primary or secondary endosymbiosis, living in freshwater or marine environments. Functions that are common to most organs and organisms are indicated on a dark background. By contrast, functions that are only found in a group of organisms (plants or microalgae) or in a specific tissue are indicated on a light background.

investigations. The study of LD roles enlightens the specificities of the responses to abiotic stresses in one given organism, as well as the differences that can exist between a single cell organism or a pluricellular one, between a primary or secondary endosymbiont, or even between freshwater algae or marine ones (Fig. 5). Oleaginous microalgae are of great biotechnological interest, for the production of biofuels or high value-added molecules such as  $\omega 3$ -fatty acids or pigments, like EPA and astaxanthin, respectively. This has considerably increased the interest for these organisms. Unfortunately, many studies solely aim to increase the productivity of compounds of interest, without looking further into the biological or ecological relevance of the results. Therefore, knowledge remains sparse on many species and few studies compare the effects of different stresses. Yet, increasing our knowledge of LD functions and of their potential adaptive roles would be of great interest in the context of global change we are facing. The combination of genomics, proteomics, lipidomics and microscopy tools that are increasingly powerful provide exciting opportunities for future research.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Juliette Jouhet, Fabrice Rébeillé, Eric Maréchal and Alberto Amato for helpful discussions. This work was supported by GRAL, a programme from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003), and programs from the CEA (FOCUS Fermeture du Cycle du Carbone (SL-DRF-20-0298)), and INRAE (BAP funding OLEuM).

## References

- Abida, H., Dolch, L. J., Mei, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M. A., et al. (2015). Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*, *167*(1), 118–136. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252395>.
- Altmann, R. (1894). *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Veit & comp.
- Arisz, S. A., Heo, J.-Y., Koevoets, I. T., Zhao, T., van Egmond, P., Meyer, A. J., et al. (2018). Diacylglycerol acyltransferase1 contributes to freezing tolerance. *Plant Physiology*, *177*(4), 1410–1424. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00503>.
- Aubert, Y., Vile, D., Pervent, M., Aldon, D., Ranty, B., Simonneau, T., et al. (2010). RD20, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *51*(12), 1975–1987. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq155>.
- Barbosa, A. D., Lim, K., Mari, M., Edgar, J. R., Gal, L., Sterk, P., et al. (2019). Compartmentalized synthesis of triacylglycerol at the inner nuclear membrane regulates nuclear organization. *Developmental Cell*, *50*(6), 755–766.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.009>.
- Baud, S. (2018). Seeds as oil factories. *Plant Reproduction*, *31*(3), 213–235. <https://doi.org/10.1007/s00497-018-0325-6>.
- Baud, S., Dichow, N. R., Kelemen, Z., d'Andréa, S., To, A., Berger, N., et al. (2009). Regulation of HSD1 in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *50*(8), 1463–1478. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp092>.
- Beevers, H. (1979). Microbodies in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, *30*(1), 159–193. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.30.060179.001111>.
- Bersuker, K., & Olzmann, J. A. (2017). Establishing the lipid droplet proteome: Mechanisms of lipid droplet protein targeting and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1862*(10, Pt. B), 1166–1177. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.006>.
- Blanc-Mathieu, R., Dahle, H., Hofgaard, A., Brandt, D., Ban, H., Kalinowski, J., et al. (2021). A persistent giant algal virus, with a unique morphology, encodes an unprecedented number of genes involved in energy metabolism. *Journal of Virology*, *95*(8), e02446–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02446-20>.
- Bosch, M., Sánchez-Álvarez, M., Fajardo, A., Kapetanovic, R., Steiner, B., Dutra, F., et al. (2020). Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense. *Science*, *370*(6514), eaay8085. <https://doi.org/10.1126/science.aay8085>.
- Bose, D., Ngo, A. H., Nguyen, V. C., & Nakamura, Y. (2021). Non-specific phospholipases C2 and C6 redundantly function in pollen tube growth via triacylglycerol production in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *106*(2), 409–418. <https://doi.org/10.1111/tpj.15172>.
- Bougnères, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B. H.-J., Chan, L., et al. (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC Class I in dendritic cells. *Immunity*, *31*(2), 232–244. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.022>.

- Brocard, L., Immel, F., Coulon, D., Esnay, N., Tuphile, K., Pascal, S., et al. (2017). Proteomic analysis of lipid droplets from *Arabidopsis* aging leaves brings new insight into their biogenesis and functions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 894. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00894>.
- Cai, Y., Goodman, J. M., Pyc, M., Mullen, R. T., Dyer, J. M., & Chapman, K. D. (2015). *Arabidopsis* SEIPIN proteins modulate triacylglycerol accumulation and influence lipid droplet proliferation. *Plant Cell*, 27(9), 2616–2636. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00588>.
- Castro, I. G., Eisenberg-Bord, M., Persiani, E., Rochford, J. J., Schuldiner, M., & Bohnert, M. (2019). Promethin is a conserved seipin partner protein. *Cell*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/cells8030268>.
- Cermelli, S., Guo, Y., Gross, S. P., & Welte, M. A. (2006). The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Current Biology*, 16(18), 1783–1795. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.062>.
- Chapman, K. D., Aziz, M., Dyer, J. M., & Mullen, R. T. (2019). Mechanisms of lipid droplet biogenesis. *The Biochemical Journal*, 476(13), 1929–1942. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180021>.
- Chapman, K. D., & Ohlrogge, J. B. (2012). Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2288–2294. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.290072>.
- Chen, E. C. F., Tai, S. S. K., Peng, C.-C., & Tzen, J. T. C. (1998). Identification of three novel unique proteins in seed oil bodies of sesame. *Plant and Cell Physiology*, 39(9), 935–941. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029457>.
- Choudhary, V., Ojha, N., Golden, A., & Prinz, W. A. (2015). A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *The Journal of Cell Biology*, 211(2), 261–271. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505067>.
- Chung, J., Wu, X., Lambert, T. J., Lai, Z. W., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2019). LADF1 and seipin form a lipid droplet assembly complex. *Developmental Cell*, 51(5), 551–563.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.006>.
- Coca, M., & Segundo, B. S. (2010). AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 63(3), 526–540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04255.x>.
- d'Andréa, S., Canonge, M., Beopoulos, A., Jolivet, P., Hartmann, M. A., Miquel, M., et al. (2007). At5g50600 encodes a member of the short-chain dehydrogenase reductase superfamily with 11 $\beta$ - and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities associated with *Arabidopsis thaliana* seed oil bodies. *Biochimie*, 89(2), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.013>.
- Davidi, L., Levin, Y., Ben-Dor, S., & Pick, U. (2015). Proteome analysis of cytoplasmatic and plastidic beta-carotene lipid droplets in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 167(1), 60–79. <https://doi.org/10.1104/pp.114.248450>.
- Degenkolbe, T., Giavalisco, P., Zuther, E., Seiwert, B., Hinch, D. K., & Willmitzer, L. (2012). Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 72(6), 972–982. <https://doi.org/10.1111/tpj.12007>.
- Deruyffelaere, C., Bouchez, I., Morin, H., Guillot, A., Miquel, M., Froissard, M., et al. (2015). Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of oleosins is involved in oil body mobilization during post-germinative seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 56(7), 1374–1387. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv056>.
- Deruyffelaere, C., Purkrtova, Z., Bouchez, I., Collet, B., Cacas, J.-L., Chardot, T., et al. (2018). PUX10 is a CDC48A adaptor protein that regulates the extraction of ubiquitinated oleosins from seed lipid droplets in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 30(9), 2116–2136. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00275>.

- Desbois, A. P., Mearns-Spragg, A., & Smith, V. J. (2009). A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology*, *11*(1), 45–52. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9118-5>.
- Dhiman, R., Caesar, S., Thiam, A. R., & Schrul, B. (2020). Mechanisms of protein targeting to lipid droplets: a unified cell biological and biophysical perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *108*, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.03.004>.
- Dias, S. S. G., Soares, V. C., Ferreira, A. C., Sacramento, C. Q., Fintelman-Rodrigues, N., Temerozo, J. R., et al. (2020). Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathogens*, *16*(12), e1009127. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009127>.
- Divi, U. K., & Krishna, P. (2009). Brassinosteroid: A biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnology*, *26*(3), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.07.006>.
- Eastmond, P. J. (2006). *SUGAR-DEPENDENT1* encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* Seeds. *The Plant Cell*, *18*(3), 665–675. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040543>.
- Fan, J., Yan, C., Roston, R., Shanklin, J., & Xu, C. (2014). *Arabidopsis* lipins, PDAT1 acyltransferase, and SDP1 triacylglycerol lipase synergistically direct fatty acids toward  $\beta$ -oxidation, thereby maintaining membrane lipid homeostasis. *The Plant Cell*, *26*(10), 4119–4134. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130377>.
- Fan, J., Yu, L., & Xu, C. (2017). A central role for triacylglycerol in membrane lipid breakdown, fatty acid  $\beta$ -oxidation, and plant survival under extended darkness. *Plant Physiology*, *174*(3), 1517–1530. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00653>.
- Fan, J., Yu, L., & Xu, C. (2019). Dual role for autophagy in lipid metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *31*(7), 1598–1613. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00170>.
- Fernandez-Santos, R., Izquierdo, Y., Lopez, A., Muniz, L., Martinez, M., Cascon, T., et al. (2020). Protein profiles of lipid droplets during the hypersensitive defense response of *Arabidopsis* against *Pseudomonas* infection. *Plant & Cell Physiology*, *61*(6), 1144–1157. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa041>.
- Ferrer, A., Altabella, T., Arro, M., & Boronat, A. (2017). Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progress in Lipid Research*, *67*, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.06.002>.
- Flori, S., Jouneau, P. H., Finazzi, G., Marechal, E., & Falconet, D. (2016). Ultrastructure of the periplastidial compartment of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist*, *167*(3), 254–267. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.04.001>.
- Footitt, S., Dietrich, D., Fait, A., Fernie, A. R., Holdsworth, M. J., Baker, A., et al. (2007). The COMATOSE ATP-binding cassette transporter is required for full fertility in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *144*(3), 1467–1480. <https://doi.org/10.1104/pp.107.099903>.
- Gaspar, M. L., Hofbauer, H. F., Kohlwein, S. D., & Henry, S. A. (2011). Coordination of storage lipid synthesis and membrane biogenesis: evidence for cross-talk between triacylglycerol metabolism and phosphatidylinositol synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(3), 1696–1708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172296>.
- Gasulla, F., Vom Dorp, K., Dombrock, I., Zähringer, U., Gisch, N., Dörmann, P., et al. (2013). The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Cratogeomys plantagineum*: A comparative approach. *The Plant Journal*, *75*(5), 726–741. <https://doi.org/10.1111/tpj.12241>.
- Gidda, S. K., Park, S., Pyc, M., Yurchenko, O., Cai, Y., Wu, P., et al. (2016). Lipid droplet-associated proteins (LDAPs) are required for the dynamic regulation of neutral lipid compartmentation in plant cells. *Plant Physiology*, *170*(4), 2052–2071. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01977>.

- Goepfert, S., & Poirier, Y. (2007).  $\beta$ -Oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.007>.
- Goodson, C., Roth, R., Wang, Z. T., & Goodenough, U. (2011). Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryotic Cell*, 10(12), 1592–1606. <https://doi.org/10.1128/EC.05242-11>.
- Goold, H. D., Cuine, S., Legeret, B., Liang, Y., Brugiere, S., Auroy, P., et al. (2016). Saturating light induces sustained accumulation of oil in plastidal lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 171(4), 2406–2417. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00718>.
- Graef, M. (2018). Lipid droplet-mediated lipid and protein homeostasis in budding yeast. *FEBS Letters*, 592(8), 1291–1303. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12996>.
- Graham, I. A. (2008). Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 115–142. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092938>.
- Greer, M. S., Cai, Y., Gidda, S. K., Esnay, N., Kretzschmar, F. K., Seay, D., et al. (2020). SEIPIN isoforms interact with the membrane-tethering protein VAP27-1 for lipid droplet formation. *The Plant Cell*, 32(9), 2932–2950. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00771>.
- Guéguen, N., Le Moigne, D., Amato, A., Salvaing, J., & Maréchal, E. (2021). Lipid droplets in unicellular photosynthetic stramenopiles. *Frontiers in Plant Science*, 12, 639276. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.639276>.
- Haldar, A. K., Saka, H. A., Piro, A. S., Dunn, J. D., Henry, S. C., Taylor, G. A., et al. (2013). IRG and GBP host resistance factors target aberrant, “Non-self” vacuoles characterized by the missing of “self” IRGM proteins. *PLoS Pathogens*, 9(6), e1003414. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003414>.
- Han, B., Xu, H., Feng, Y., Xu, W., Cui, Q., & Liu, A. (2020). Genomic characterization and expressional profiles of autophagy-related genes (ATGs) in oilseed crop castor bean (*Ricinus communis* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 562. <https://doi.org/10.3390/ijms21020562>.
- Hayashi, M., & Nishimura, M. (2003). Entering a new era of research on plant peroxisomes. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(6), 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.09.012>.
- Henne, M., Goodman, J. M., & Hariri, H. (2020). Spatial compartmentalization of lipid droplet biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(1), 158499. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.07.008>.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., et al. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature Medicine*, 16(11), 1295–1298. <https://doi.org/10.1038/nm.2238>.
- Higashi, Y., Okazaki, Y., Myouga, F., Shinozaki, K., & Saito, K. (2015). Landscape of the lipidome and transcriptome under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep10533>.
- Higashi, Y., Okazaki, Y., Takano, K., Myouga, F., Shinozaki, K., Knoch, E., et al. (2018). HEAT INDUCIBLE LIPASE1 remodels chloroplastic monogalactosyldiacylglycerol by liberating  $\alpha$ -linolenic acid in *Arabidopsis* leaves under heat stress. *The Plant Cell*, 30(8), 1887–1905. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00347>.
- Higashi, Y., & Saito, K. (2019). Lipidomic studies of membrane glycerolipids in plant leaves under heat stress. *Progress in Lipid Research*, 75, 100990. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.100990>.
- Hinson, E. R., & Cresswell, P. (2009). The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic  $\alpha$ -helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), 20452–20457. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911679106>.

- Horn, P. J., James, C. N., Gidda, S. K., Kilaru, A., Dyer, J. M., Mullen, R. T., et al. (2013). Identification of a new class of lipid droplet-associated proteins in plants. *Plant Physiology*, 162(4), 1926–1936. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222455>.
- Hsu, T.-H., Chen, R.-H., Cheng, Y.-H., & Wang, C.-W. (2017). Lipid droplets are central organelles for meiosis II progression during yeast sporulation. *Molecular Biology of the Cell*, 28(3), 440–451. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-06-0375>.
- Hu, X., Binns, D., & Reese, M. L. (2017). The coccidian parasites toxoplasma and neospora dysregulate mammalian lipid droplet biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 292(26), 11009–11020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.768176>.
- Huang, A. H. C. (1992). Oil bodies and oleosins in seeds. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1), 177–200. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.001141>.
- Huang, A. H. C. (2018). Plant lipid droplets and their associated proteins: Potential for rapid advances. *Plant Physiology*, 176(3), 1894–1918. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01677>.
- Huang, B., Marchand, J., Thiriet-Rupert, S., Carrier, G., Saint-Jean, B., Lukomska, E., et al. (2019). Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta). *Algal Research*, 40, 101506. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101506>.
- Hulatt, C. J., Smolina, I., Dowle, A., Kopp, M., Vasanth, G. K., Hoarau, G. G., et al. (2020). Proteomic and transcriptomic patterns during lipid remodeling in *Nannochloropsis gaditana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6946. <https://doi.org/10.3390/ijms21186946>.
- Ischebeck, T. (2016). Lipids in pollen—They are different. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(9 Pt. B), 1315–1328. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.03.023>.
- Ischebeck, T., Krawczyk, H. E., Mullen, R. T., Dyer, J. M., & Chapman, K. D. (2020). Lipid droplets in plants and algae: Distribution, formation, turnover and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.014>.
- James, C. N., Horn, P. J., Case, C. R., Gidda, S. K., Zhang, D., Mullen, R. T., et al. (2010). Disruption of the Arabidopsis CGI-58 homologue produces Cholesterol-Dorfman-like lipid droplet accumulation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(41), 17833–17838. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911359107>.
- Jaussaud, A., Lupette, J., Salvaing, J., Jouhet, J., Bastien, O., Gromova, M., et al. (2020). Stepwise biogenesis of subpopulations of lipid droplets in nitrogen starved *Phaeodactylum tricorutum* cells. *Frontiers in Plant Science*, 11(48). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00048>.
- Joshi, A. S., Nebenfuehr, B., Choudhary, V., Satpute-Krishnan, P., Levine, T. P., Golden, A., et al. (2018). Lipid droplet and peroxisome biogenesis occur at the same ER subdomains. *Nature Communications*, 9(1), 2940. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05277-3>.
- Joshi, A. S., Ragusa, J. V., Prinz, W. A., & Cohen, S. (2021). Multiple C2 domain-containing transmembrane proteins promote lipid droplet biogenesis and growth at specialized endoplasmic reticulum subdomains. *Molecular Biology of the Cell*, 32(12), 1147–1157. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-09-0590>.
- Kaup, M. T., Froese, C. D., & Thompson, J. E. (2002). A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiology*, 129(4), 1616–1626. <https://doi.org/10.1104/pp.003087>.
- Kelly, A. A., Quettier, A.-L., Shaw, E., & Eastmond, P. J. (2011). Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 157(2), 866–875. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181784>.



- Kretzschmar, F. K., Doner, N. M., Krawczyk, H. E., Scholz, P., Schmitt, K., Valerius, O., et al. (2020). Identification of low-abundance lipid droplet proteins in seeds and seedlings. *Plant Physiology*, *182*(3), 1326–1345. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01255>.
- Kretzschmar, F. K., Mengel, L. A., Müller, A. O., Schmitt, K., Blersch, K. F., Valerius, O., et al. (2018). PUX10 is a lipid droplet-localized scaffold protein that interacts with CELL DIVISION CYCLE48 and is involved in the degradation of lipid droplet proteins. *The Plant Cell*, *30*(9), 2137–2160. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00276>.
- Kumar, Y., Cocchiario, J., & Valdivia, R. H. (2006). The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets. *Current Biology*, *16*(16), 1646–1651. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.060>.
- Légeret, B., Schulz-Raffelt, M., Nguyen, H. M., Auroy, P., Beisson, F., Peltier, G., et al. (2016). Lipidomic and transcriptomic analyses of *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress unveil a direct route for the conversion of membrane lipids into storage lipids. *Plant, Cell & Environment*, *39*(4), 834–847. <https://doi.org/10.1111/pce.12656>.
- Leyland, B., Boussiba, S., & Khozin-Goldberg, I. (2020). A review of diatom lipid droplets. *Biology (Basel)*, *9*, 38. <https://doi.org/10.3390/biology9020038>.
- Leyland, B., Zarka, A., Didi-Cohen, S., Boussiba, S., & Khozin-Goldberg, I. (2020). High resolution proteome of lipid droplets isolated from the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum* (*Bacillariophyceae*) strain pt4 provides mechanistic insights into complex intracellular coordination during nitrogen deprivation. *Journal of Phycology*, *56*(6), 1642–1663. <https://doi.org/10.1111/jpy.13063>.
- Li, F., Asami, T., Wu, X., Tsang, E. W. T., & Cutler, A. J. (2007). A putative hydroxysteroid dehydrogenase involved in regulating plant growth and development. *Plant Physiology*, *145*(1), 87–97. <https://doi.org/10.1104/pp.107.100560>.
- Li, X., Moellering, E. R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B. B., et al. (2012). A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, *24*(11), 4670–4686. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105106>.
- Li, Z., Thiel, K., Thul, P. J., Beller, M., Kühnlein, R. P., & Welte, M. A. (2012). Lipid droplets control the maternal histone supply of *Drosophila* embryos. *Current Biology*, *22*(22), 2104–2113. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.018>.
- Li, D., Yang, S.-G., He, C.-W., Zhang, Z.-T., Liang, Y., Li, H., et al. (2020). Excess diacylglycerol at the endoplasmic reticulum disrupts endomembrane homeostasis and autophagy. *BMC Biology*, *18*(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00837-w>.
- Lin, L.-J., Tai, S. S. K., Peng, C.-C., & Tzen, J. T. C. (2002). Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies. *Plant Physiology*, *128*(4), 1200–1211. <https://doi.org/10.1104/pp.010982>.
- Lu, Y., Wang, X., Balamurugan, S., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Dong, H.-P., et al. (2017). Identification of a putative seipin ortholog involved in lipid accumulation in marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Applied Phycology*, *29*(6), 2821–2829. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1173-8>.
- Lundquist, P. K., Shivaiah, K.-K., & Espinoza-Corral, R. (2020). Lipid droplets throughout the evolutionary tree. *Progress in Lipid Research*, *78*, 101029. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101029>.
- Lupette, J., Jaussaud, A., Seddiki, K., Morabito, C., Brugière, S., Schaller, H., et al. (2019). The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Algal Research*, *38*, 101415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101415>.
- Lupette, J., & Maréchal, E. (2020). The puzzling conservation and diversification of lipid droplets from bacteria to eukaryotes. In M. Kloc (Ed.), *Vol. 69. Symbiosis: Cellular, molecular, medical and evolutionary aspects* (pp. 281–334). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-51849-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51849-3_11).

- Ma, F., Wang, L., & Wang, Y. (2018). Ectopic expression of VpSTS29, a stilbene synthase gene from *Vitis pseudoreticulata*, indicates STS presence in cytosolic oil bodies. *Planta*, 248(1), 89–103. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2883-0>.
- Malitsky, S., Ziv, C., Rosenwasser, S., Zheng, S., Schatz, D., Porat, Z., et al. (2016). Viral infection of the marine alga *Emiliania huxleyi* triggers lipidome remodeling and induces the production of highly saturated triacylglycerol. *New Phytologist*, 210(1), 88–96. <https://doi.org/10.1111/nph.13852>.
- Martin, B. A., & Wilson, R. F. (1984). Subcellular localization of triacylglycerol synthesis in spinach leaves. *Lipids*, 19(2), 117–121. <https://doi.org/10.1007/bf02534501>.
- Miray, R., Kazaz, S., To, A., & Baud, S. (2021). Molecular control of oil metabolism in the endosperm of seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1621. <https://doi.org/10.3390/ijms22041621>.
- Miyinari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., et al. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology*, 9(9), 1089–1097. <https://doi.org/10.1038/ncb1631>.
- Moellering, E. R., & Benning, C. (2010). RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 9(1), 97–106. <https://doi.org/10.1128/EC.00203-09>.
- Moellering, E. R., Muthan, B., & Benning, C. (2010). Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*, 330(6001), 226–228. <https://doi.org/10.1126/science.1191803>.
- Mueller, S. P., Krause, D. M., Mueller, M. J., & Fekete, A. (2015). Accumulation of extra-chloroplastic triacylglycerols in *Arabidopsis* seedlings during heat acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 66(15), 4517–4526. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv226>.
- Mueller, S. P., Unger, M., Guender, L., Fekete, A., & Mueller, M. J. (2017). Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase-mediated triacylglycerol synthesis augments basal thermotolerance. *Plant Physiology*, 175(1), 486–497. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00861>.
- Mulders, K. J. M., Lamers, P. P., Wijffels, R. H., & Martens, D. E. (2015). Dynamics of biomass composition and growth during recovery of nitrogen-starved *Chromochloris zofingiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1873–1884. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6181-x>.
- Muller, A. O., & Ischebeck, T. (2018). Characterization of the enzymatic activity and physiological function of the lipid droplet-associated triacylglycerol lipase AtOBL1. *The New Phytologist*, 217(3), 1062–1076. <https://doi.org/10.1111/nph.14902>.
- Murphy, D. J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: From archaea to mammals. *Protoplasma*, 249(3), 541–585. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0329-7>.
- Næsted, H., Frandsen, G. I., Jauh, G.-Y., Hernandez-Pinzon, I., Nielsen, H. B., Murphy, D. J., et al. (2000). Caleosins: Ca<sup>2+</sup>-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Molecular Biology*, 44(4), 463–476. <https://doi.org/10.1023/A:1026564411918>.
- Nguyen, H. M., Baudet, M., Cuine, S., Adriano, J. M., Barthe, D., Billon, E., et al. (2011). Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: With focus on proteins involved in lipid metabolism. *Proteomics*, 11(21), 4266–4273. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100114>.
- Nojima, D., Yoshino, T., Maeda, Y., Tanaka, M., Nemoto, M., & Tanaka, T. (2013). Proteomics analysis of oil body-associated proteins in the oleaginous diatom. *Journal of Proteome Research*, 12(11), 5293–5301. <https://doi.org/10.1021/pr4004085>.
- Nonoyama, T., Nojima, D., Maeda, Y., Noda, M., Yoshino, T., Matsumoto, M., et al. (2019). Proteomics analysis of lipid droplets indicates involvement of membrane trafficking proteins in lipid droplet breakdown in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris*. *Algal Research*, 44, 101660. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101660>.
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(3), 137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>.

- Parthibane, V., Rajakumari, S., Venkateshwari, V., Iyappan, R., & Rajasekharan, R. (2012). Oleosin is bifunctional enzyme that has both monoacylglycerol acyltransferase and phospholipase activities. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1946–1954. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.309955>.
- Pereira-Dutra, F. S., Teixeira, L., de Costa, M. F. S., & Bozza, P. T. (2019). Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 106(3), 563–580. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR.0119-035R>.
- Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L. J., Bastien, O., Rebeille, F., et al. (2014). Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways—From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research*, 54, 68–85. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.02.001>.
- Petschnigg, J., Wolinski, H., Kolb, D., Zellnig, G., Kurat, C. F., Natter, K., et al. (2009). Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 30981–30993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024752>.
- Pick, U., Zarka, A., Boussiba, S., & Davidi, L. (2019). A hypothesis about the origin of carotenoid lipid droplets in the green algae *Dunaliella* and *Haematococcus*. *Planta*, 249(1), 31–47. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3050-3>.
- Prasanna, X., Salo, V. T., Li, S., Ven, K., Vihinen, H., Jokitalo, E., et al. (2021). Seipin traps triacylglycerols to facilitate their nanoscale clustering in the endoplasmic reticulum membrane. *PLoS Biology*, 19(1), e3000998. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000998>.
- Pyc, M., Cai, Y., Gidda, S. K., Yurchenko, O., Park, S., Kretschmar, F. K., et al. (2017). Arabidopsis lipid droplet-associated protein (LDAP)-Interacting protein (LDIP) influences lipid droplet size and neutral lipid homeostasis in both leaves and seeds. *The Plant Journal*, 92(6), 1182–1201. <https://doi.org/10.1111/tpj.13754>.
- Pyc, M., Gidda, S. K., Seay, D., Esnay, N., Kretschmar, F. K., Cai, Y., et al. (2021). LDIP cooperates with SEIPIN and LDAP to facilitate lipid droplet biogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, koab179. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab179>.
- Quettier, A.-L., Shaw, E., & Eastmond, P. J. (2008). *SUGAR-DEPENDENT6* encodes a mitochondrial flavin adenine dinucleotide-dependent glycerol-3-P dehydrogenase, which is required for glycerol catabolism and postgerminative seedling growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 148(1), 519–528. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123703>.
- Rosenwasser, S., Mausz, M. A., Schatz, D., Sheyn, U., Malitsky, S., Aharoni, A., et al. (2014). Rewiring host lipid metabolism by large viruses determines the fate of *Emiliana huxleyi*, a bloom-forming alga in the ocean. *The Plant Cell*, 26(6), 2689–2707. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125641>.
- Santinho, A., Salo, V. T., Chorlay, A., Li, S., Zhou, X., Omrane, M., et al. (2020). Membrane curvature catalyzes lipid droplet assembly. *Current Biology*, 30, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.066>.
- Shimada, T. L., Hayashi, M., & Hara-Nishimura, I. (2018). Membrane dynamics and multiple functions of oil bodies in seeds and leaves. *Plant Physiology*, 176(1), 199–207. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01522>.
- Shimada, T. L., Shimada, T., Takahashi, H., Fukao, Y., & Hara-Nishimura, I. (2008). A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 55(5), 798–809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03553.x>.
- Shimada, T. L., Takano, Y., Shimada, T., Fujiwara, M., Fukao, Y., Mori, M., et al. (2014). Leaf oil body functions as a subcellular factory for the production of a phytoalexin in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 164(1), 105–118. <https://doi.org/10.1104/pp.113.230185>.
- Siloto, R. M. P., Findlay, K., Lopez-Villalobos, A., Yeung, E. C., Nykiforuk, C. L., & Moloney, M. M. (2006). The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(8), 1961–1974. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041269>.

- Simionato, D., Block, M. A., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., et al. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryotic Cell*, 12(5), 665–676.
- Singh, A. P., & Savaldi-Goldstein, S. (2015). Growth control: Brassinosteroid activity gets context. *Journal of Experimental Botany*, 66(4), 1123–1132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv026>.
- Sorger, D., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., & Daum, G. (2004). A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31190–31196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403251200>.
- Tan, W.-J., Yang, Y.-C., Zhou, Y., Huang, L.-P., Xu, L., Chen, Q.-F., et al. (2018). DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE and DIACYLGLYCEROL KINASE modulate triacylglycerol and phosphatidic acid production in the plant response to freezing stress. *Plant Physiology*, 177(3), 1303–1318. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00402>.
- Tarazona, P., Feussner, K., & Feussner, I. (2015). An enhanced plant lipidomics method based on multiplexed liquid chromatography–mass spectrometry reveals additional insights into cold- and drought-induced membrane remodeling. *The Plant Journal*, 84(3), 621–633. <https://doi.org/10.1111/tpj.13013>.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., & Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44507–44512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207712200>.
- Taurino, M., Costantini, S., De Domenico, S., Stefanelli, F., Ruano, G., Delgadillo, M. O., et al. (2018). SEIPIN proteins mediate lipid droplet biogenesis to promote pollen transmission and reduce seed dormancy. *Plant Physiology*, 176(2), 1531–1546. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01430>.
- Thiam, A. R., & Forêt, L. (2016). The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(8, Pt. A), 715–722. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.04.018>.
- Tsai, C.-H., Uygun, S., Roston, R., Shiu, S.-H., & Benning, C. (2018). Recovery from N deprivation is a transcriptionally and functionally distinct state in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, 176(3), 2007–2023. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01546>.
- Tsai, C. H., Zienkiewicz, K., Amstutz, C. L., Brink, B. G., Warakanont, J., Roston, R., et al. (2015). Dynamics of protein and polar lipid recruitment during lipid droplet assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 83(4), 650–660. <https://doi.org/10.1111/tpj.12917>.
- Tzen, J.-T.-C., Cao, Y.-Z., Laurent, P., Ratnayake, C., & Huang, A.-H.-C. (1993). Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiology*, 101(1), 267–276. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.267>.
- Vardi, A., Mooy, B. A. S. V., Fredricks, H. F., Pependorf, K. J., Ossolinski, J. E., Haramaty, L., et al. (2009). Viral glycosphingolipids induce lytic infection and cell death in marine phytoplankton. *Science*, 326(5954), 861–865. <https://doi.org/10.1126/science.1177322>.
- Velázquez, A. P., Tatsuta, T., Ghillebert, R., Drescher, I., & Graef, M. (2016). Lipid droplet-mediated ER homeostasis regulates autophagy and cell survival during starvation. *Journal of Cell Biology*, 212(6), 621–631. <https://doi.org/10.1083/jcb.201508102>.
- Vevea, J. D., Garcia, E. J., Chan, R. B., Zhou, B., Schultz, M., Di Paolo, G., et al. (2015). Role for lipid droplet biogenesis and microlipophagy in adaptation to lipid imbalance in yeast. *Developmental Cell*, 35(5), 584–599. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.11.010>.
- Vieler, A., Brubaker, S. B., Vick, B., & Benning, C. (2012). A lipid droplet protein of *nannochloropsis* with functions partially analogous to plant oleosins. *Plant Physiology*, 158(4), 1562–1569. <https://doi.org/10.1104/pp.111.193029>.

- Walther, T. C., Chung, J., & Farese, R. V. (2017). Lipid droplet biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33, 491–510. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616060608>.
- Wang, X., Hao, T.-B., Balamurugan, S., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Dong, H.-P., et al. (2017). A lipid droplet-associated protein involved in lipid droplet biogenesis and triacylglycerol accumulation in the oleaginous microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Algal Research*, 26, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.028>.
- Wang, K., Hersh, H. L., & Benning, C. (2016). SENSITIVE TO FREEZING2 aids in resilience to salt and drought in freezing-sensitive tomato. *Plant Physiology*, 172(3), 1432–1442. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01183>.
- Wang, S., Idrissi, F.-Z., Hermansson, M., Grippa, A., Ejsing, C. S., & Carvalho, P. (2018). Seipin and the membrane-shaping protein Pex30 cooperate in organelle budding from the endoplasmic reticulum. *Nature Communications*, 9(1), 2939. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05278-2>.
- Wang, X., Wei, H., Mao, X., & Liu, J. (2019). Proteomics analysis of lipid droplets from the oleaginous alga *Chromochloris zofingiensis* reveals novel proteins for lipid metabolism. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 17(3), 260–272. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.01.003>.
- Yoneda, K., Yoshida, M., Suzuki, I., & Watanabe, M. M. (2016). Identification of a major lipid droplet protein in a marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant & Cell Physiology*, 57(2), 397–406. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv204>.
- Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2012). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 24(9), 3708–3724. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100701>.
- You, Z., Zhang, Q., Peng, Z., & Miao, X. (2019). Lipid droplets mediate salt stress tolerance in *Parachlorella kessleri*. *Plant Physiology*, 181(2), 510–526. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00666>.
- Yu, L., Zhou, C., Fan, J., Shanklin, J., & Xu, C. (2021). Mechanisms and functions of membrane lipid remodeling in plants. *The Plant Journal*, 107, 37–53. <https://doi.org/10.1111/tpj.15273>.
- Zhang, M., Fan, J., Taylor, D. C., & Ohlrogge, J. B. (2010). *DGAT1* and *PDAT1* acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *The Plant Cell*, 21(12), 3885–3901. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071795>.
- Zienkiewicz, K., Castro, A. J., de Alché, J. D., Zienkiewicz, A., Suárez, C., & Rodríguez-García, M. I. (2010). Identification and localization of a caleosin in olive (*Olea europaea* L.) pollen during in vitro germination. *Journal of Experimental Botany*, 61(5), 1537–1546. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq022>.
- Zienkiewicz, A., Zienkiewicz, K., Rejón, J. D., Rodríguez-García, M. I., & Castro, A. J. (2013). New insights into the early steps of oil body mobilization during pollen germination. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 293–302. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers332>.
- Zoni, V., Khaddaj, R., Lukmantara, I., Shinoda, W., Yang, H., Schneiter, R., et al. (2021). Seipin accumulates and traps diacylglycerols and triglycerides in its ring-like structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(10), e2017205118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017205118>.



## La protéine Seipin

La protéine Seipin a été identifiée initialement chez l'humain. Une mutation du gène codant cette protéine est responsable d'une maladie rare, de prévalence 1-9/1 000 000, connue sous le nom de Lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip (BSCL), classée comme syndrome lypodystrophique généralisé (*Orphanet: Lipodystrophie congénitale de Berardinelli Seip*). Les patients atteints souffrent d'une absence quasi-totale de tissus adipeux dès la naissance mais d'une accumulation de graisses dans les muscles et le foie. Ils peuvent présenter en contrepartie une musculature proéminente et sont souvent sujets à des diabètes de type 1 (insulino dépendant). La qualité de vie se trouve très fortement impactée : des piqûres quotidiennes d'hormones comme l'insuline permettant de réguler le taux de glucose sanguin ou de leptine régulant le sentiment de satiété sont nécessaires.

Le gène impliqué dans cette maladie a été identifié en 2001 par des criblages génétiques en partant du postulat que des enfants atteints seraient homozygotes pour un même allèle (Magré *et al.*, 2001). L'identification d'un locus dans l'intervalle chromosomique 11q13 a permis de mettre en évidence des délétions d'exons et d'identifier le gène *BSCL2* (Berardinelli Seipin Congenital Lipodystrophy 2), nommé Seipin (ou Seipine) en hommage au médecin Martin Seip qui a décrit en premier la maladie.

Brièvement, la Seipin est une protéine transmembranaire localisée au réticulum endoplasmique (RE). Elle est composée d'un domaine luménal, d'au moins deux domaines transmembranaires et de parties N et C terminales cytosoliques. Un gène unique est identifié chez une majorité d'espèces dont les mammifères, insectes, algues... Néanmoins chez l'Homme, deux transcrits d'ARN (1,8 et 2,4 kb) sont exprimés dans la majorité des tissus et un transcrit de 2 kb semble spécifiquement exprimé dans le cerveau (Magré *et al.*, 2001). Chez les plantes, jusqu'à 3 isoformes de la Seipin ont été identifiées comme c'est le cas chez *Arabidopsis thaliana* (Cai *et al.*, 2015). La levure *Saccharomyces cerevisiae* représente un cas particulier, car deux protéines assurent la fonction Seipin, les protéines Fld1 et Ldb16. La protéine Fld1, comprenant la plus grande partie du domaine luménal, est parfois nommée Seipin par abus de langage. La protéine Ldb16 comprend des domaines transmembranaires, un domaine luménal très réduit ainsi que les segments cytosoliques.

Dans cette partie introductive, un état de l'art de la fonction de la protéine Seipin et de son implication dans la biogenèse de la gouttelette lipidique (LD) est proposé dans un premier temps. Le détail plus précis de la structure moléculaire des domaines qui ont pu être identifiés en Cryo-EM est donné dans une seconde partie et enfin nous présentons les connaissances relatives aux interactions que Seipin établit avec des partenaires protéiques ainsi qu'aux mécanismes moléculaires qui ont été élucidés dans la biogenèse de la LD dans une dernière partie.

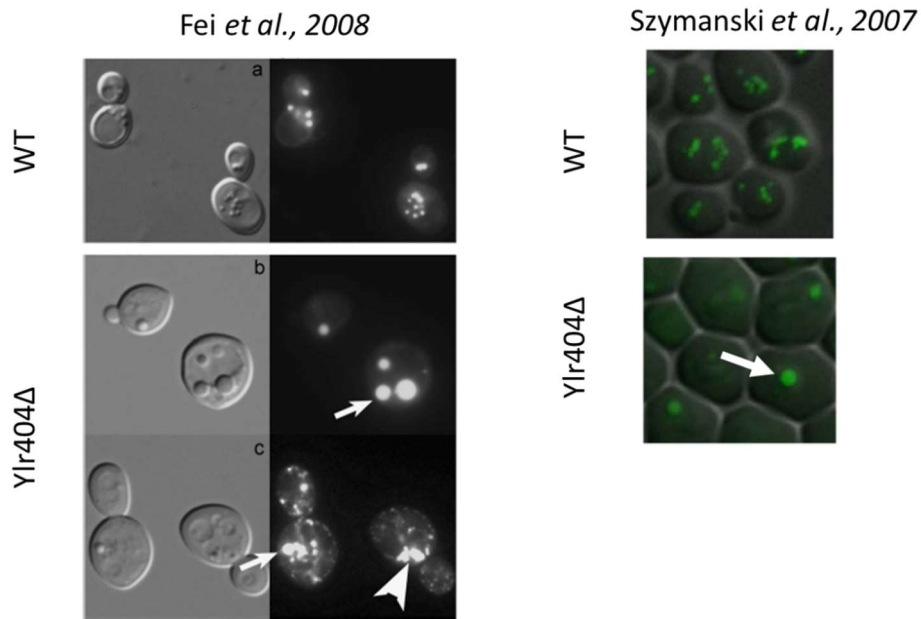
## 1 Etudes fonctionnelles de la Seipin et implication dans la biogenèse des gouttelettes lipidiques

De nombreuses études fonctionnelles du gène ont été menées chez plusieurs organismes modèles (levures, insectes, mammifères, plantes) voire dans plusieurs types cellulaires pour le même organisme (homme notamment) et il apparaît compliqué de généraliser les phénotypes observés. En effet, des différences sont observées entre organismes modèles ou lignées cellulaires knock-out (KO) pour la Seipin. Les réponses morphologiques (tailles des LD, nombres, accumulation de TAG) qui découlent de cette mutation et qui sont rapportées dans les différentes études divergent parfois. Nous présentons d'abord ce qui a été observé chez la levure, puis ce qui a été rapporté chez les mammifères et les animaux ainsi que chez les plantes.

### 1.1 Fonction de la Seipin dans la formation de la LD chez *Saccharomyces cerevisiae*

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la Seipin a été identifiée par des approches de criblages génétiques dans deux études indépendantes (Szymanski *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2008). Des lignées dont les mutations génétiques aléatoires menaient à une modification du phénotype (soit de la taille soit du nombre) des LD ont permis d'identifier le gène *FLD1* (aussi nommé *YLR404W* et plus récemment *SEI1*) comme candidat principal, car sa mutation aboutissait à un phénotype différent des autres lignées. Dans les lignées mutantes KO, les LD étaient soit significativement plus grandes (dans environ 30% de la population cellulaire) soit nombreuses et agrégées (dans environ 60% de la population). Concernant les 10% restants, la morphologie des LD est également affectée, elles apparaissent irrégulières en quantité et en taille ainsi que très difformes et mal définies (Fei *et al.*, 2008) (**Figure 18**). Dans cette étude fonctionnelle, les auteurs ont montré que chez les mutants KO Seipin, les LD d'apparence extrêmement larges peuvent résulter de la fusion de plusieurs LD plus petites. Les proportions de cellules contenant ces LD de tailles différentes s'expliquent donc par l'observation d'individus à différentes « étapes » de la biosynthèse des LD, pré- ou post-fusion. Chez les mutants KO, des grosses gouttelettes sont également relevées en phase stationnaire de croissance cellulaire (Szymanski *et al.*, 2007).





**Figure 18 : Observations microscopiques des LD dans des cellules de levure KO Seipin.** Les gouttelettes sont marquées par un fluorophore et les LD difformes sont indiquées par une flèche chez les mutants.

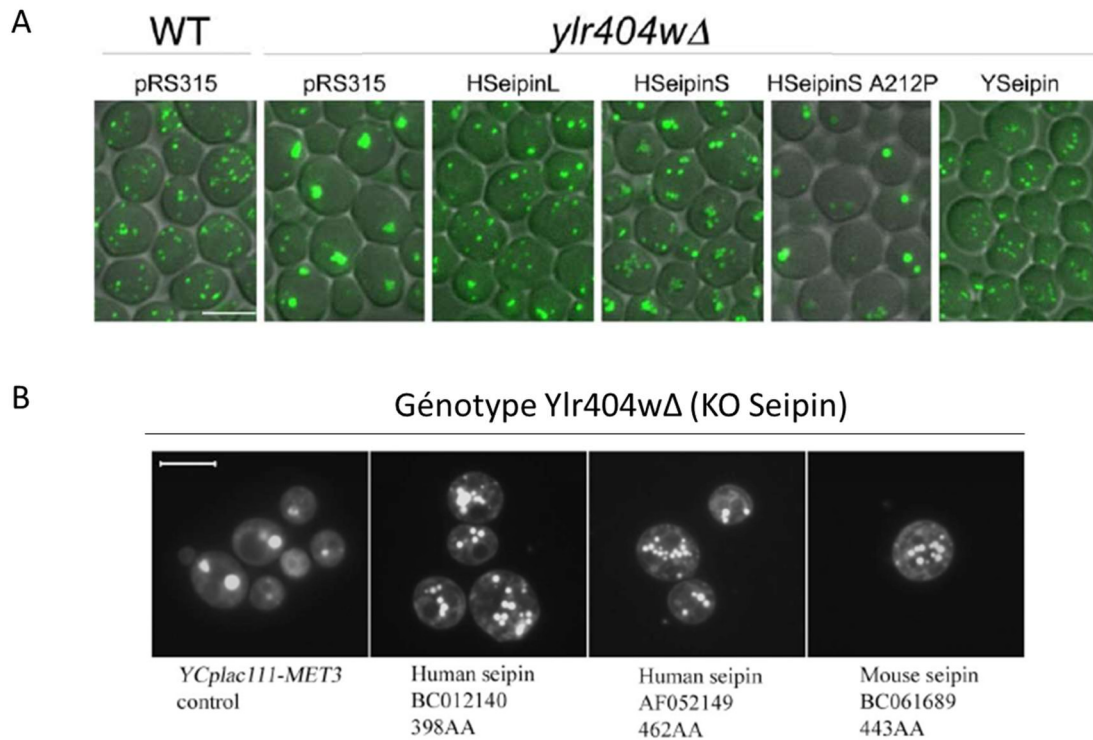
Il semblerait également que la taille et la morphologie des LD présentes dans les cellules KO Seipin dépendent de la composition et de l'enrichissement du milieu de culture. En phase stationnaire, après avoir été cultivées dans un milieu riche, les cellules possèdent des LD nombreuses et agrégées alors que dans un milieu moins riche, les gouttelettes sont pour la plupart de taille importante (Szymanski et al., 2007; Fei et al., 2008; Wolinski et al., 2011). Lorsque ces cellules sont transférées dans un nouveau milieu complet, cela aboutit au remplacement des LD de grandes tailles par des tailles réduites et agrégées caractéristiques du milieu complet (Wolinski et al., 2011). La présence de LD bourgeonnant à partir de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire est également relevée dans des cellules de levures KO Seipin, suggérant également un rôle important de cette protéine dans l'orientation du bourgeonnement de la gouttelette vers le cytosol (Cartwright et al., 2015).

De façon intéressante, chez la levure, la localisation de la lipase Tgl3 à la surface de la LD chez des mutants Seipin est affectée (Wolinski et al., 2011). Au lieu d'une localisation précise et concentrée en un point à la surface des LD, les auteurs constatent soit un signal diffus soit une absence de signal autour des LD. Cela suggère que chez la levure, la Seipin est requise pour la localisation correcte des lipases autour de la LD par un mécanisme encore non identifié.

### 1.1.1 Complémentation hétérologue des mutants Seipin de levure

Lorsque l'on complémente les cellules de levure KO Seipin par les isoformes de mammifères (Homme et souris, **Figure 19**), la morphologie des LD est restaurée à une taille comparable au sauvage (Fei et al., 2008). De plus, la complémentation de lignées de levures KO Seipin par l'isoforme de la Seipin

humaine portant une des mutations identifiées comme responsable de la maladie de Berardinelli-Seip (mutation A212P) ne permet pas de restaurer le phénotype (**Figure 19**) (Szymanski *et al.*, 2007). Ces observations soutiennent l'hypothèse d'un rôle fonctionnel conservé de la Seipin dans la biogenèse des LD entre les espèces.



**Figure 19 : Observation en microscopie de lignées de levures KO Seipin complétement par différents isoformes.** (A). De gauche à droite : levure sauvage, lignée KO Seipin transformée avec un vecteur contrôle, lignée KO complétement avec l'isoforme long de la Seipin humaine (HSeipinL), l'isoforme court de la Seipin humaine (HSeipinS), l'isoforme court muté en position A212P responsable de la maladie de BSCL2 (HSeipinS A212P) et l'isoforme endogène de la levure (YSeipin). Images reprises de (Szymanski *et al.*, 2007). (B). De gauche à droite : lignée KO Seipin transformée avec un vecteur contrôle, lignée KO complétement avec l'isoforme court de la Seipin humaine, l'isoforme long de la Seipin humaine et l'isoforme de la souris. Images reprises de (Fei *et al.*, 2008).

Dans les organismes multicellulaires et pluri tissulaires, un niveau de complexité supérieur est rapporté et décrit ci-après.

Dans tous les modèles étudiés, il est rapporté que la Seipin se localise au niveau du RE, en lieu et place de la biogenèse des LD (Perktold *et al.*, 2007; Szymanski *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Des données soulignent, en outre, que la Seipin ne doit pas être considérée comme une structure fixe insérée dans la membrane mais comme une structure dynamique mobile à la surface du RE. Lorsque la Seipin rencontre un site potentiel pour un futur bourgeonnement de LD, elle s'immobilise et permet la formation d'une LD mature (Wang *et al.*, 2016; Sui *et al.*, 2018). Ces

sites particuliers sont probablement composés d'une accumulation de lipides neutres entre les deux feuillettes de la membrane, avec des protéines supplémentaires permettant de former des complexes protéiques spécifiques (*cf.* La protéine Seipin, partie 3, p84).

### 1.2 *Implication et fonction de la Seipin dans les modèles animaux et levures*

Lorsque l'expression de la Seipin est réduite par ARN interférence dans des lignées de cellules humaines HeLa cultivées sur un milieu oléate, une augmentation de TAG de 40 à 70% est observée (Fei, Li, *et al.*, 2011). À l'inverse, les cellules HeLa surexprimant la Seipin présentent une quantité de TAG réduite et un nombre de LD plus faible. Par contre, les niveaux de transcrits des enzymes impliquées dans la synthèse des TAG (DGAT, GPAT) ne sont pas affectés. De la même manière, des cellules pré-adipocytaires non différenciées (lignées 3T3-L1) dans lesquelles l'expression de la Seipin est réduite par ARN interférence montrent une accumulation de TAG (Fei, Li, *et al.*, 2011).

Inversement, la mutation de la Seipin chez les patients atteints de la maladie de Berardinelli-Seip entraîne une perte quasiment totale de tissus adipeux ce qui est assez paradoxal avec l'accumulation de TAG que l'on observe dans les lignées HeLa ou chez la levure, par exemple. On sait que l'expression de la Seipin est normalement forte dans les tissus adipeux (Liu *et al.*, 2014). Des modèles murins KO Seipin ont été développés (Cui *et al.*, 2011) et montrent les mêmes phénotypes que ceux observés chez l'Homme : on y retrouve une quantité de tissus adipeux très réduits (Magré *et al.*, 2001; Agarwal and Garg, 2004; Payne *et al.*, 2008) ainsi que des traits diabétiques, notamment une résistance à l'insuline. De manière similaire à ce qui est observé chez la levure, dans des cellules humaines lymphoblastoïdes issues de patients atteints de la maladie de Berardinelli-Seip, les LD apparaissent plus petites, nombreuses et agrégées lorsqu'elles sont observées en microscopie confocale (Boutet *et al.*, 2009). En microscopie électronique, leurs contours sont très diffus et bien moins définis que dans des lignées contrôle.

Cette perte très importante de tissus adipeux rend bien évidemment difficile la possibilité d'approfondir les analyses sur ces tissus. D'autres travaux ont été conduits dans des lignées modèles physiologiquement plus proches des tissus concernés pour tenter d'expliquer comment la lipodystrophie se met en place en l'absence de la Seipin. Ainsi, des modèles de souris pour lesquelles l'inactivation du gène Seipin a été effectuée uniquement dans les tissus adipeux déjà formés ont été développés ; cela a permis de montrer que la Seipin est également requise pour le maintien de l'homéostasie lipidique dans des adipocytes matures (Liu *et al.*, 2014). Les lignées KO montrent une perte progressive des adipocytes matures et une augmentation des facteurs inflammatoires dans ces tissus.

### 1.2.1 Relation entre la Seipin et le métabolisme des lipides

Dans les lignées lymphoblastoïdes humaines KO Seipin, il est observé dans les TAG et la PC une augmentation de la quantité d'acides palmitique (16:0) et stéarique (18:0) au dépend des acides mono insaturés palmitoléique (16:1) et oléique (C18:1). L'activité de l'enzyme stearoyl-CoA desaturase 1 ( $\Delta 9$ -desaturase) pourrait être responsable de ce phénotype : en effet, elle semble dérégulée par la perte de la Seipin sans qu'une interaction directe ait été mise en évidence (Boutet *et al.*, 2009). Cette enzyme est localisée au niveau du réticulum endoplasmique dans des micro-domaines contenant des enzymes de la biosynthèse des TAGs notamment celle catalysant la dernière étape de synthèse des TAGS, la diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2).

D'autres travaux conduits par Pagac *et al.*, 2016, mettent en évidence une interaction entre la Seipin et certaines isoformes des enzymes impliquées dans la première étape de la formation des TAG, les glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT). Les GPAT catalysent l'estérification d'un acyl-CoA sur du glycerol-3-phosphate pour former de l'acide phosphatidique (PA). Chez la levure, ainsi que dans des cellules mammifères, il est montré une interaction entre la Seipin et certaines GPAT (GPAT3 et 4, localisées au réticulum endoplasmique) par co-immunoprécipitations. L'interaction directe entre la Seipin et GPAT3 dans des lignées pré-adipocytaires a été confirmée par microscopie à force atomique (AFM) et implique très probablement les domaines transmembranaires de la Seipin (Sim *et al.*, 2020). Les auteurs ont également montré que cette interaction régule négativement l'activité de la GPAT : en l'absence de Seipin, l'activité de GPAT est deux fois plus importante et mène à une accumulation de PA (Pagac *et al.*, 2016).

### 1.2.2 Relation entre la Seipin et l'acide phosphatidique

L'acide phosphatidique (PA) est un glycérophospholipide négativement chargé composant des membranes organisées en bicouche lipidique. C'est aussi un intermédiaire de synthèse notamment des glycérolipides (voir Introduction métabolisme des lipides) et possède également des rôles de signalisation. Il peut influencer sur la courbure de la membrane et peut également être chélaté par des ions  $Ca^{2+}$  pour former des micro domaines membranaires sensibles à divers paramètres physico chimiques (Température, pH). Plusieurs protéines et enzymes peuvent être affectées par le PA (Stillwell, 2016). Le PA est un précurseur des DAG et des TAG et peut être synthétisé directement par la 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (AGPAT2) (Wendel *et al.*, 2009 ; Fei *et al.*, 2011) à partir de l'acide lyso-phosphatidique (LPA) lui-même produit par la GPAT.

Plusieurs études rapportent une accumulation intracellulaire de PA dans les mutants KO Seipin. On relèvera notamment l'accumulation de PA dans des microsomes isolés de levures mutantes Seipin (Fei, Shui, *et al.*, 2011) et l'accumulation de protéines liant le PA dans certains domaines de

l'enveloppe nucléaire chez des levures déficientes pour la Seipin (Han *et al.*, 2015; Wolinski *et al.*, 2015). Les microsomes sont des microstructures résultant de la fragmentation d'organites, principalement du RE ainsi que de l'appareil de Golgi.

Une autre étude met en évidence que la Seipin interagit avec AGPAT2 ainsi qu'avec PA phosphatase, appelée lipin 1, pour réguler la quantité de PA (Talukder *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2022) dans des cellules adipocytaires en développement. Il en découle alors deux conséquences : la quantité de TAG synthétisés augmente et le PA qui s'accumule inhibe le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR $\gamma$ ), un facteur de transcription clé du métabolisme des lipides et qui empêche la différenciation des pré adipocytes en adipocytes (Pagac *et al.*, 2016). Enfin, les travaux menés sur la structure de la Seipin de l'Homme montrent spécifiquement que la Seipin peut lier du PA avec une forte affinité pour le PA 16:0/18:1 grâce à un domaine « C2-like » présent dans le domaine luménal (Yan *et al.*, 2018). Cela suggère également que la Seipin peut sélectionner spécifiquement des PA avec des chaînes d'acides gras spécifiques.

Ensemble, ces éléments peuvent expliquer pourquoi en l'absence de Seipin, la différenciation des adipocytes est affectée. Ils mettent également en évidence son rôle dans la gestion du pool de PA intracellulaire.

### 1.2.3 Implications de la Seipin dans l'homéostasie du calcium

Il a été montré chez la drosophile et l'Homme que la partie luminale de la Seipin peut interagir physiquement avec la pompe à calcium SERCA. Cette pompe permet de transférer les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) depuis le cytoplasme vers le RE (Bi *et al.*, 2014). Il a été suggéré que Seipin et SERCA fonctionnent de concert dans la formation des LD dans le tissu adipeux ; lorsque l'un ou l'autre est absent, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique augmente significativement aux dépens de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum endoplasmique. Il a également été montré que la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  diminue dans les mitochondries des KO Seipin chez la drosophile et que des fonctions du métabolisme primaire essentielles comme le cycle de Calvin sont très fortement affectées (Ding *et al.*, 2018). Lorsque les niveaux de calcium mitochondriaux sont restaurés, il est possible de restaurer la taille des LD chez les KO Seipin de manière comparable au sauvage. En outre, chez l'Homme (dans des lignées de carcinome de l'épiderme A431) ou chez la souris (lignées de pré-adipocyte 3T3-L1), la Seipin est enrichie sur des sites de contacts entre RE et mitochondrie (Combot *et al.*, 2022). Cet enrichissement est d'autant plus important que les conditions nécessitent une remobilisation des lipides. En effet, la co-localisation de la Seipin à la mitochondrie et à proximité des transporteurs IPR3/SERCA2 augmente en condition de carence et est diminuée en condition de cultures riches lorsque les cellules peuvent accumuler des lipides de stockage. Néanmoins, la durée de vie de la co-

localisation entre la Seipin et la mitochondrie semble faible (de l'ordre de 10 secondes). Enfin, les co-immunoprécipitations de Seipin situées aux sites de contact ER-Mitochondrie ont permis d'identifier deux transporteurs de calcium (SERCA2 et IP3R).

#### 1.2.4 La Seipin est cruciale pour la liaison de la LD au cytosquelette

Les LD peuvent bouger dans la cellule par diffusion libre, par mouvements Brownien ou bien selon des mouvements directionnels impliquant le cytosquelette et les éléments moteurs qui y sont associés comme les kinésines, dynéines, myosines (J. Huang *et al.*, 2023). Ces mouvements permettent, par exemple, un adressage des LD à différents organites et il a été montré que le cytosquelette jouait un rôle au cours de la cytokinèse dans le transfert et l'héritabilité de la LD chez la levure et que la protéine Seipin y tenait un rôle important (Wolinski *et al.*, 2011).

Les auteurs ont cultivé des levures sauvages jusqu'en phase stationnaire en laissant les cellules accumuler de l'huile ; on note que la majorité des LD qui se sont accumulées sont très centrées dans la cellule. Lorsqu'ils rajoutent des nutriments, on voit apparaître des petites gouttelettes en périphérie de la cellule. Puis la levure commence à se diviser et former une excroissance qui donnera une cellule fille dans laquelle une ou deux de ces petites LD y sont immédiatement transférées. Au fur et à mesure que cette excroissance grossit, on note une corrélation entre nombre de LD et taille de l'excroissance ce qui suggère qu'un nombre proportionnel de gouttelettes y sont transférées. Le suivi en temps réel du mouvement de la LD entre cellule mère et cellule fille en plein bourgeonnement montre qu'il s'agit bien d'un transfert et non d'une fragmentation de la LD depuis la cellule mère suivi d'une formation *de novo* dans la cellule fille. Ces mouvements de LD sont très vraisemblablement dépendants de l'actine, car ils ne sont plus observés lorsque la drogue latrunculin A, dégradant l'actine, est utilisée (Wolinski *et al.*, 2011). Tout au long de ce transfert d'une cellule à une autre, les LD restent également associées à des extensions du RE. Dans les cellules KO Seipin, cette héritabilité est fortement affectée. Il est observé que la surface de contact entre les LD géantes des KO Seipin et le RE est augmentée, ce qui peut également être une cause du manque de mobilité de la LD dans la cellule et entraîner des troubles de l'héritabilité.

### 1.3 Cas particulier des Seipin chez les plantes

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, trois isoformes distinctes de Seipin (ci-après nommées AtSeipin1, 2 et 3) séparées en deux groupes monophylétiques ont été identifiées (Cai *et al.*, 2015), mais relativement peu d'études fonctionnelles de ces protéines ont été conduites. Les premiers travaux portant sur la caractérisation de ces isoformes ont montré que la surexpression de chacune d'entre elles, seules ou en combinaison, en système hétérologue dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana* permet de moduler la quantité et la taille des LD ainsi que d'augmenter la quantité

d'huile dans ce même tissu (Cai *et al.*, 2015). De plus, contrairement à AtSeipin 2 et 3, AtSeipin1 ne permet pas de rétablir la taille des LD dans des levures KO Seipin. Le domaine N terminal des Seipin de plantes a été identifié comme un élément crucial dans la modulation de la taille des gouttelettes. Comme AtSeipin1 est l'isoforme la plus exprimée dans les graines qui sont des tissus riches en huile, cette isoforme y a été examinée de manière plus approfondie. Ainsi, sa surexpression dans les graines d'*Arabidopsis* permet d'augmenter la taille des LD et la quantité d'huile tandis que la diminution de son expression par ARN interférence a l'effet inverse, c'est-à-dire une diminution de la taille des LD et de la quantité d'huile (Cai *et al.*, 2015). Une étude fonctionnelle au cours de laquelle des combinaisons de mutants KO AtSeipin ont été générés révèlent des LD très larges et surdimensionnées dans les double-KO AtSeipin2 et 3 et encore plus larges dans les triples-KO (Taurino *et al.*, 2018). Dans l'hypocotyle, qui est un tissu jeune émergeant de la graine, ces double- (AtSeipin 2 et 3) et triple-KO ne parviennent pas à remobiliser les lipides essentiels à la germination et imposent indirectement une dormance aux graines (Taurino *et al.*, 2018).

Une remobilisation importante des lipides stockés dans la graine est précisément nécessaire durant la germination et est affectée dans les mutants Seipin. Le ratio surface/volume des LD de grandes tailles étant diminué, les auteurs ont suggéré que l'accès des lipases participant à cette remobilisation est affectée. Pour rappel, la localisation de la lipase Tgl3 à la surface de la gouttelette lipidique chez des levures mutantes Seipin est affectée (voir 1.1) (Wolinski *et al.*, 2011).

### 1.3.1 Implication de la partie N-terminale dans le contrôle de la taille de la gouttelette

Les domaines cytosoliques N- et C-terminaux de la Seipin sont faiblement conservés et peuvent être de tailles variables entre différentes espèces. La structure de ces domaines variables n'a pas pu être élucidée même lorsque la structure du domaine luménal de Seipin a été résolue (*cf.* La protéine Seipin, partie 2, p78). De même, des outils d'intelligence artificielle comme AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021a) ne prédisent que des structures assez désordonnées avec de faibles taux de confiance. Néanmoins, plusieurs études mettent en évidence que la partie N-terminale est impliquée dans le contrôle de la taille des LD.

Chez la levure, cette partie est réduite à quelques acides aminés. Lorsque des lignées KO sont complétées par une Seipin endogène tronquée immédiatement avant le premier domaine transmembranaire, le nombre de LD est restauré mais la proportion de LD surdimensionnées augmente significativement (Cartwright *et al.*, 2015).

Pour étudier plus finement le rôle de ce domaine N-terminal, il semble particulièrement pertinent de s'intéresser aux Seipin de plantes, car les différentes isoformes présentent des domaines N-

terminaux de tailles différentes. Les isoformes *AtSeipin2* et *AtSeipin3* possèdent toutes deux un domaine N-terminal plus grand que *AtSeipin1* (Cai *et al.*, 2015). Des inversions de ce domaine entre *AtSeipin1* et *AtSeipin3* ont été réalisées. L'expression transitoire chez *Nicotiana bentamiana* de *AtSeipin3* avec le court domaine N-terminal de *AtSeipin1* augmente considérablement la taille des LD (Cai *et al.*, 2015). Lorsque *AtSeipin1* est utilisée pour compléter des levures KO Seipin, les LD y sont également significativement plus grosses que dans le WT et que dans la lignée KO.

Il est intéressant de relever que *AtSeipin1* est l'isoforme exprimée majoritairement dans les graines, tissus riche en lipides dans lesquels une quantité importante de TAGs est nécessaire pour assurer notamment la germination. Son expression ou l'expression d'une autre isoforme mais possédant la partie N-terminale de *AtSeipin1* dans d'autres tissus et d'autres organismes influe fortement sur la quantité de TAGs accumulés dans les LD.

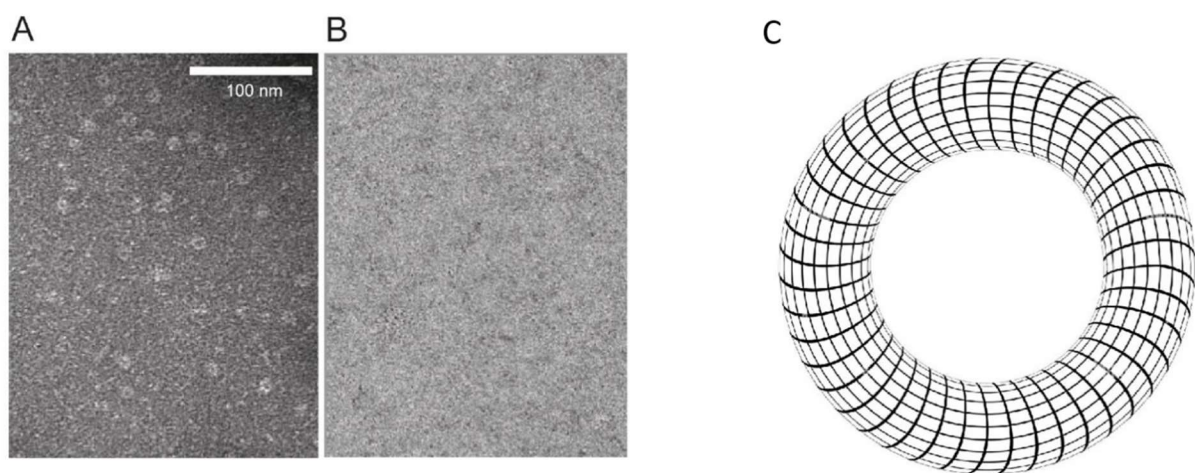
## 2 Structure de la Seipin

### 2.1 *Evaluation de la structure de Seipin par des approches biochimiques*

Les premiers travaux portant sur la structure de la Seipin avaient permis d'identifier que le domaine N-terminal se situe dans le lumen du RE (Windpassinger *et al.*, 2004). Les prédictions informatiques par THMMM (transmembrane hidden Markov model) renvoyaient alors à deux domaines transmembranaires et les auteurs se sont attelés à comprendre précisément la topologie de la Seipin, c'est-à-dire la manière dont elle s'insère dans la membrane du RE (Lundin *et al.*, 2006). La séquence de la protéine totale humaine a été clonée et modifiée pour y introduire des sites de glycosylation (Asn-Ser-Thr) en région N- et C-terminal ainsi qu'entre les deux domaines transmembranaires putatifs. Les protéines modifiées ont été incubées avec des microsomes (fractions du RE obtenues par ultracentrifugation). Ces structures microsomaux conservent les propriétés du RE et de l'appareil de Golgi contenant entre autres les enzymes nécessaires à la glycosylation des protéines. La glycosylation permet de lier de façon covalente un glucide à la chaîne peptidique. Cette modification post-traductionnelle a lieu dans le lumen du RE et de l'appareil de Golgi, ce qui correspond à la partie intérieure du microsome. Ainsi, les protéines Seipin comportant différentes combinaisons de sites de glycosylation sont incubées avec les microsomes et selon leur insertion, vont pouvoir ou non, être modifiées. Si la réaction se fait, un décalage du poids moléculaire de la protéine est observé, car la migration sur gel se trouve affectée par l'ajout du groupement glucide. Les auteurs ont ainsi pu montrer que les Seipin comportant les sites de glycosylation en N et C terminal n'étaient pas modifiées alors que les Seipin comportant le site entre les domaines transmembranaires l'étaient. Ils ont ainsi pu en déduire l'orientation topologique de la protéine dans la membrane du RE avec des domaines N- et C-terminaux faisant face au cytosol tandis que la boucle entre les domaines transmembranaires se positionne dans le lumen du réticulum.



Des études postérieures ont été menées sur la Seipin de levure (*fld1*) chez *Saccharomyces cerevisiae* pour la simplicité d'utilisation en laboratoire de ce modèle (Binns *et al.*, 2010). Alors que les auteurs essayaient initialement d'identifier des partenaires de la Seipin à partir de membranes solubilisées au Triton X100, il a été observé que la Seipin existe sous la forme d'un large complexe de haut poids moléculaire. Il a également pu être démontré que la Seipin existe sous la forme d'homo-oligomère en estimant à neuf le nombre de monomères qui composent le complexe. Une purification des complexes de Seipin associée à un tag myc et séparée par un site de clivage TEV a permis de confirmer la nature homo-oligomérique de Seipin (Binns *et al.*, 2010). Enfin, les auteurs ont également observé l'oligomère Seipin sous forme toroïdale en microscopie électronique (**Figure 20**).



**Figure 20 : L'oligomère de Seipin forme une structure toroïdale.** Images de microscopie électronique en marquage négatif. **A** : Seipin-myc13 purifiées. **B** : témoin négatif, cellules ne surexprimant pas Seipin-myc13. Crédit image : Binns *et al.*, 2010. **C** : Exemple d'une forme géométrique toroïdale.

### 2.1.1 Cas particulier de la levure

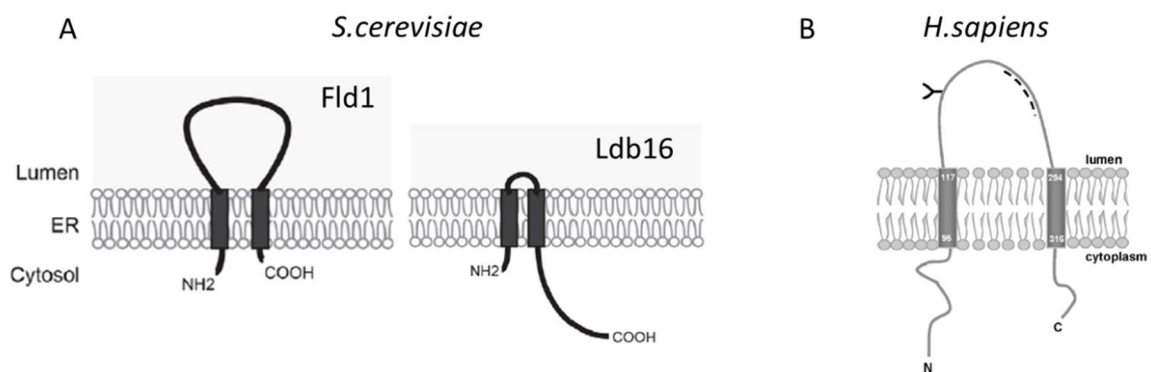
La Seipin chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* représente un cas particulier comparé à celle des autres organismes eucaryotes. En effet, la fonction Seipin est assurée par deux protéines interagissant entre elles, la protéine Ldb16 et la protéine Fld1 (Wang, Miao and Chang, 2014; Grippa *et al.*, 2015; Klug *et al.*, 2021).

La protéine Ldb16 dont les lignées KO présentaient un phénotype similaire aux mutants Fld1, a été confirmée comme un partenaire de Fld1 (Wang, Miao and Chang, 2014). Les deux protéines semblent interagir via leur domaine transmembranaire. De manière intéressante, il a également été montré que Fld1 protège Ldb16 de sa dégradation par la voie protéasomale 26S (initiée par la voie de dégradation associée au ER, ERAD). La machinerie ERAD permet de contrôler la qualité des protéines importées dans le RE ayant subies des modifications post traductionnelles. Des protéines dont la

structure est anormale vont être reconnues par cette machinerie complexe et vont être ubiquitinées avant d'être transportées vers le cytosol pour une dégradation par la voie protéasomale 26S.

Enfin, une complémentation des mutants simples ou des doubles mutants Fld1 $\Delta$ , Ldb16 $\Delta$  par la Seipin humaine permet de restaurer le phénotype KO confirmant que l'interaction de ces deux protéines assure un rôle fonctionnel de type Seipin (Wang, Miao and Chang, 2014).

Au point de vue topologique, Fld1 présente la large boucle luménale caractéristique de Seipin mais des extrémités N- et C-terminales très réduites. À l'inverse, Ldb16 possède une partie luménale très réduite mais une partie cytosolique plus longue essentiellement C-terminale (**Figure 21A**). La combinaison de Fld1 et Ldb16 permet d'obtenir les caractéristiques topologiques de la Seipin de l'Homme par exemple (**Figure 21B**).



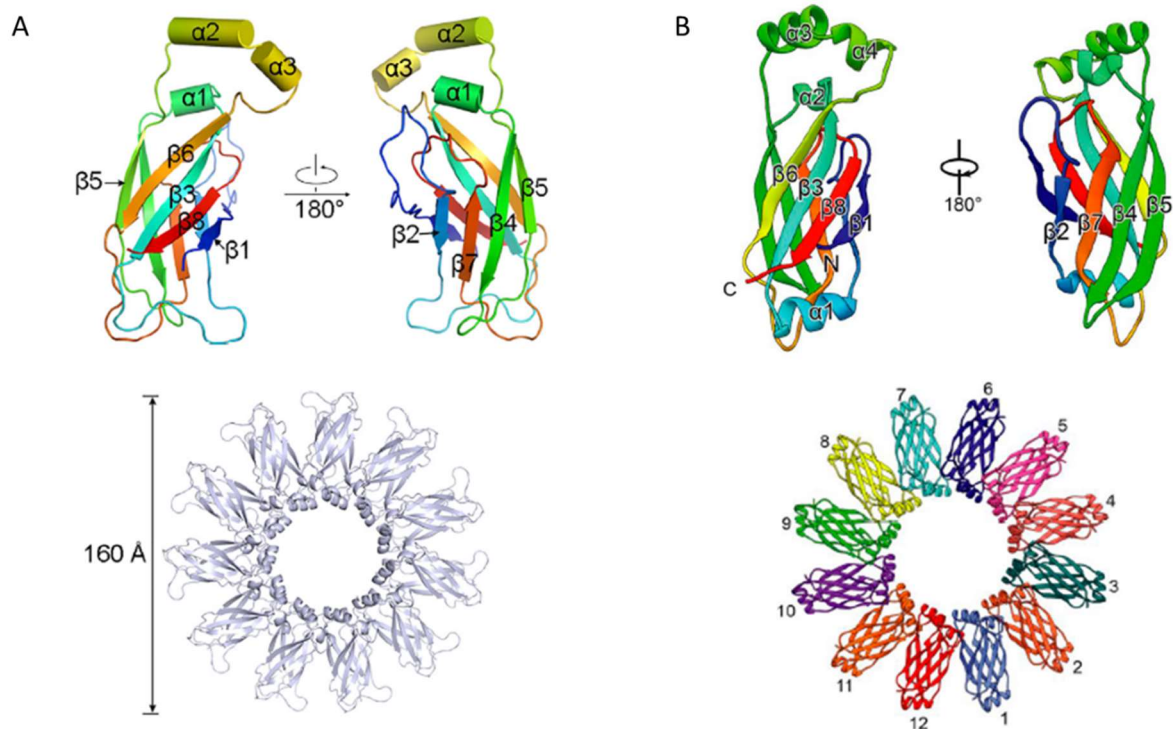
**Figure 21 : Schéma de l'orientation topologique des protéines Fld1 et Ldb16 comparé à la protéine Seipin de l'Homme.** (A) Fld1 possède une large partie luménale mais des extrémités N- et C-terminales très courtes alors que Ldb16 possède une petite boucle luménale mais une extrémité C-terminale cytoplasmique plus longue (Wang et al., 2014). La Seipin humaine présente une boucle luménale comparable à celle de Fld1 et une extrémité cytosolique longue comparable à celle de Ldb16 (Lundin et al., 2004).

## 2.2 Résolution à l'échelle moléculaire de la structure du domaine luménal

Il a fallu attendre l'arrivée des techniques de cryo-microscopie électronique pour que les structures des Seipin issues de trois organismes différents (Homme, drosophile, levure) soient résolues et publiées. La nature transmembranaire de cette protéine rend difficile sa purification et sa solubilisation pour des applications de microscopie électronique. C'est pourquoi les deux premières structures des Seipin résolues chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et l'Homme (*Homo sapiens*), publiées à quelques jours d'intervalles (Sui et al., 2018; Yan et al., 2018), ont porté sur la résolution structurale du domaine luménal soluble (Figure 2A et 2B). Ce domaine est encadré par les deux domaines transmembranaires. Ces travaux de recherche structurale ont ainsi confirmé que la Seipin formait un homo-oligomère et que la structure toroïdale observée par (Binns et al., 2010) était permise grâce à un assemblage symétrique de monomères de Seipin via des résidus spécifiques,

notamment les résidus très conservés Y230 et Y171 chez *D.melanogaster* (Sui *et al.*, 2018). Lorsque Y171 est muté, l'oligomérisation est totalement abolie *in vitro* (Sui *et al.*, 2018). Par des approches d'études fonctionnelles de résidus spécifiques, il a été montré que l'oligomérisation est essentielle pour la fonction de la Seipin (Yan *et al.*, 2018).

Onze et douze monomères composent la structure totale de l'oligomère respectivement chez l'Homme et la drosophile (**Figure 22**).



**Figure 22 : Représentation structurale du domaine luminal de la Seipin** (haut) et de l'oligomère en forme d'anneau (bas) des Seipin de l'Homme (A) (Yan *et al.*, 2018)) et de la drosophile (B) (Sui *et al.*, 2018).

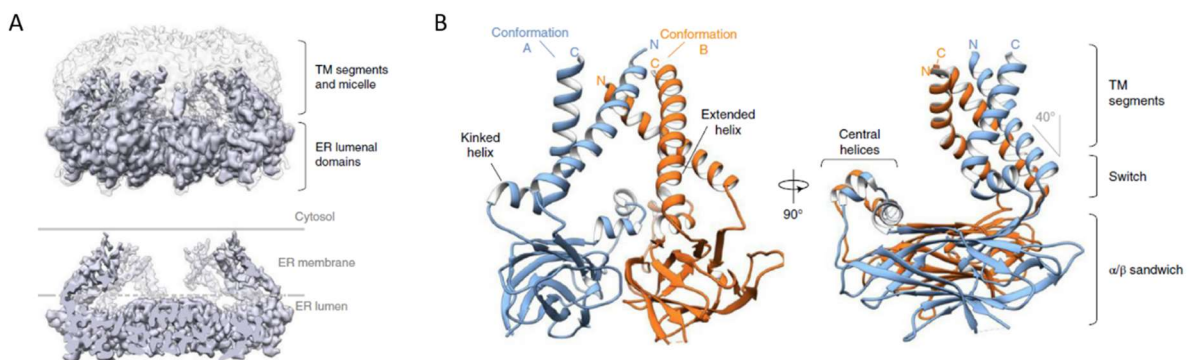
Différents domaines essentiels pour lesquels les structures sont très conservées ont ainsi été identifiés :

- Deux enchaînements de quatre brins  $\beta$  antiparallèles formant chacun un feuillet  $\beta$  sont reliés par une petite hélice  $\alpha$ . Cet enchaînement forme un « tonneau-Beta » exclusivement luminal qui est fréquemment rencontré dans des protéines pouvant lier des lipides. Par exemple, cette structure a été comparée à celle de la protéine Niemann Pick C2 (NPC2) pouvant lier des lipides comme des stérols mais également des phospholipides comme la phosphatidylserine (PS) (Sui *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018).

- Au moins trois hélices  $\alpha$  sont présentes parmi lesquelles deux (**Figure 22** :  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  chez l'Homme,  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$  chez la drosophile) présentent un fort degré d'hydrophobicité les impliquant, d'une part dans l'ancrage à la membrane du réticulum mais également dans le ciblage de Seipin vers des zones du réticulum endoplasmique présentant des défauts d'organisation des phospholipides à cause de l'accumulation de lipides neutres dans une lentille lipidique. Ces hélices pourraient ainsi être considérées comme des structures permettant de « scanner » la surface du réticulum à la recherche de ces lentilles lipidiques afin d'y adresser la Seipin.

### 2.3 Résolution à l'échelle moléculaire de la structure des domaines transmembranaires

Chez la levure *S.cerevisiae*, des travaux plus récents (Arlt *et al.*, 2022) ont apporté de manière cruciale des éléments de fonction et de structure des domaines transmembranaires (TM) de la Seipin. La résolution atomique a été réalisée à partir du complexe Fld1/Ldb16, mais seule la structure de Fld1 est montrée (**Figure 23**).

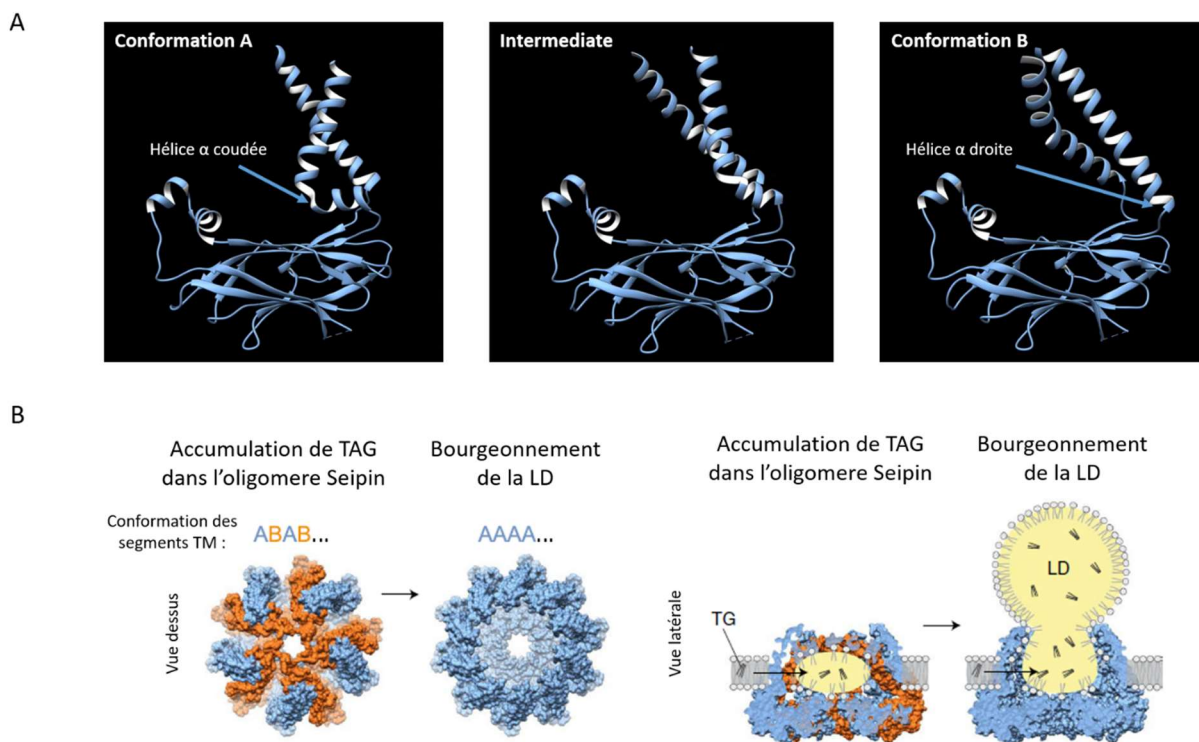


**Figure 23** : Les domaines transmembranaires de Seipin (Fld1) chez la levure *S.cerevisiae* forment une cage et adoptent deux conformations différentes. A : Carte de densité électronique obtenue en Cryo-EM. Le domaine luménal de Seipin forme la base de la cage alors que les domaines transmembranaires forment les parois. B : Les monomères de Seipin s'alternent en deux conformations distinctes (conformations A et B) par des courbures différentes au niveau de leurs domaines transmembranaires. D'après Arlt *et al.*, 2022.

Chez des levures KO, lorsque l'on cherche à restaurer la fonction par une Seipin dont les domaines TM ont été substitués par ceux d'une autre protéine transmembranaire (FIT2), le nombre et la taille des LD ne sont pas rétablis, ce qui suggère un rôle essentiel pour ces TM. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la faible résolution des TM observés sur les cartes de densités électroniques obtenues en cryo-EM pouvaient refléter une hétérogénéité dans leur positionnement dans la membrane. Au sein de l'oligomère, alors que chacun des domaines luménaux qui le composent sont identiques, deux conformations distinctes se dégagent pour les TM, lesquels forment ensemble une cage physique. Ces deux conformations (notées A et B, **Figure 23**) s'alternent l'une après l'autre tout

le long de l'oligomère. Ainsi dans la conformation A, l'entièreté de l'hélice TM N-terminale est inclinée d'environ 40° vers le centre de l'oligomère, alors que l'hélice TM C-terminale présente à la base une petite hélice  $\alpha$  coudée. Dans la conformation B, l'hélice TM C-terminale n'est pas coudée et présente une conformation étendue (**Figure 24A**), ce qui a pour conséquence d'incliner davantage l'hélice TM N-terminale vers le centre de l'oligomère.

Dans la structure imposée par la conformation B, un espace suffisant est créé entre les deux membranes du RE permettant l'accumulation de molécules neutres comme les TAGs. Ainsi la transition vers un oligomère composé uniquement de Seipin dont les chaînes TM sont dans la conformation A permettent une ouverture de la structure et facilitent le bourgeonnement de la LD vers le cytosol (**Figure 24B**). Les domaines luménaux forment le socle de la cage et empêchent un bourgeonnement vers le lumen du RE.



**Figure 24 : Modèle moléculaire du passage entre la conformation A et la conformation B et implication dans le bourgeonnement de la LD.** (A) : La transition depuis la conformation B vers la conformation A permet la transition de l'oligomère Seipin total d'une position « fermée » en une position « ouverte ». (B) : Les TAG sont physiquement capturés dans la cage imposée par la conformation B puis libérés au moment de la transition vers la conformation A permettant le bourgeonnement de la gouttelette lipidique. Artl et al., 2022.

Les prédictions de structure concernant ces domaines transmembranaires chez d'autres espèces montrent également la présence de cette hélice  $\alpha$  coudée ce qui suggère que le mécanisme pourrait être conservé à travers le règne du vivant.

Un modèle de fonctionnement de la protéine Seipin peut ainsi être proposé à partir des données structurales obtenues par la communauté scientifique. Néanmoins, ce modèle de fonctionnement ne prend pas en considération que le bon fonctionnement de la Seipin est aussi dépendant de l'interaction et de la collaboration avec d'autres protéines intégrées aux LDAC (complexes protéiques associés aux gouttelettes lipidiques).

### 3 La Seipin recrute spécifiquement des partenaires protéiques

#### 3.1 Protéine Ldo45 chez la levure et son homologue LDAF1 chez l'Homme

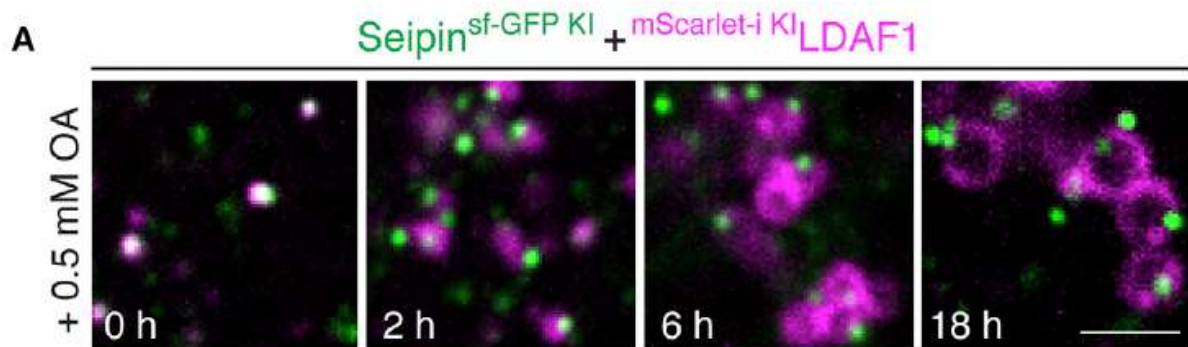
La compréhension du fonctionnement de la Seipin doit également se faire en recherchant des partenaires protéiques potentiels pouvant intervenir de concert avec elle pour assurer le contrôle de la biogenèse des LD.

La recherche de partenaires protéiques a été réalisée de manière assez classique par co-immunoprécipitation de la Seipin seule chez l'Homme (Castro *et al.*, 2019; Chung *et al.*, 2019) et/ou du partenaire fonctionnel Ldb16 chez la levure (Eisenberg-Bord *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2018). Ces études ont toutes mis en évidence chez l'Homme la présence de la protéine TMEM159 (ou Promethin), renommée LDAF1 plus récemment (Chung *et al.*, 2019). Chez la levure, la protéine Ldo45 a été identifiée comme homologue de LDAF1 (Eisenberg-Bord *et al.*, 2018).

Les hélices hydrophobes (hélices HH) présentes dans le domaine luménal apparaissent très conservées du point de vue de la séquence (Szymanski *et al.*, 2007), et ont été proposées comme un site d'interaction probable avec des partenaires protéiques par Chung *et al.*, 2019. Lorsque les auteurs ont co-immunoprécipité les partenaires de la Seipin dépourvue du domaine contenant les hélices HH, ils ont pu constater la perte de LDAF1, ce qui suggère que les hélices HH sont le site d'interaction entre LDAF1 et la Seipin. En revanche (Castro *et al.*, 2019), ont montré que la partie N-terminale cytosolique de la Seipin chez l'Homme n'était pas impliquée dans cette interaction.

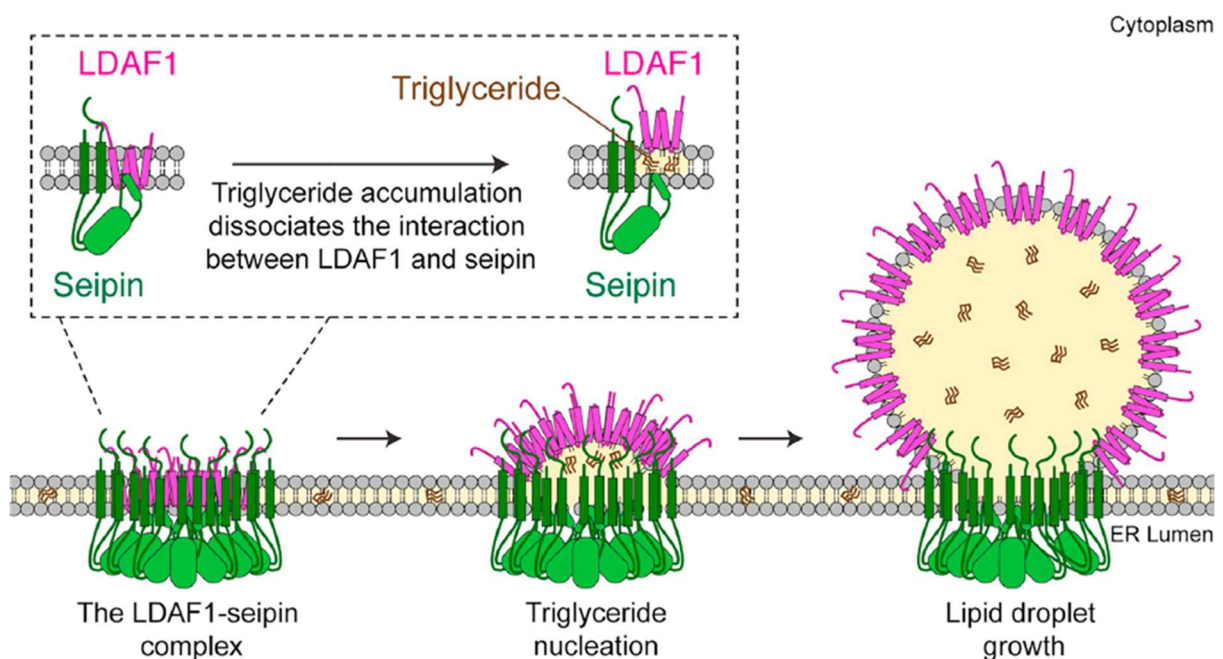
De plus, il a été mis en évidence que les LD néoformées apparaissent pour 80% du temps dans des domaines membranaires contenant à la fois Seipin et LDAF1 (Chung *et al.*, 2019). Cela suggère que l'interaction entre la Seipin et LDAF1 intervient à des stades précoces de formation des LD (**Figure 25**), et très probablement après liaison de lipides neutres à la Seipin, ce qui explique que l'on retrouve des TAGs copurifiés avec les complexes LDAF1-Seipin (Chung *et al.*, 2019). Si LDAF1 s'associe avec la Seipin dans un ratio stœchiométrique de 1:1, la quantité de domaines hydrophobes augmenterait drastiquement et permettrait de concentrer d'autant plus de lipides neutres puisque l'association entre les deux protéines augmente localement l'hydrophobicité. L'accumulation de TAGs pourrait contraindre mécaniquement LDAF1 à se dissocier de la Seipin mais en restant associée à la monocouche de la LD, conduisant ainsi à sa localisation à la surface chez une gouttelette plus

mature (**Figure 26**). LDAF1 n'est plus détectée au RE après plusieurs heures de maturation après la formation de la LD, ce qui suggère que LDAF1 relocalise depuis le RE à la LD grâce à la Seipin.



**Figure 25 : Co-localisation de Seipin et LDAF1 dans des cellules SUM159.** La protéine LDAF1 (violet) co-localise avec la Seipin (Vert) aux stades précoces de formation de la LD soit à 0h après induction par l'acide oleique. Après maturation de la LD au bout de 18h, la protéine LDAF1 se dissocie de la Seipin et recouvre la surface des LD. Chung et al., 2019.

Lorsque l'on module l'expression de la Seipin par surexpression, on observe une répartition différente de LDAF1, qui ne recouvre plus correctement la gouttelette lipidique et qui se retrouve anormalement localisée et accumulée au RE.



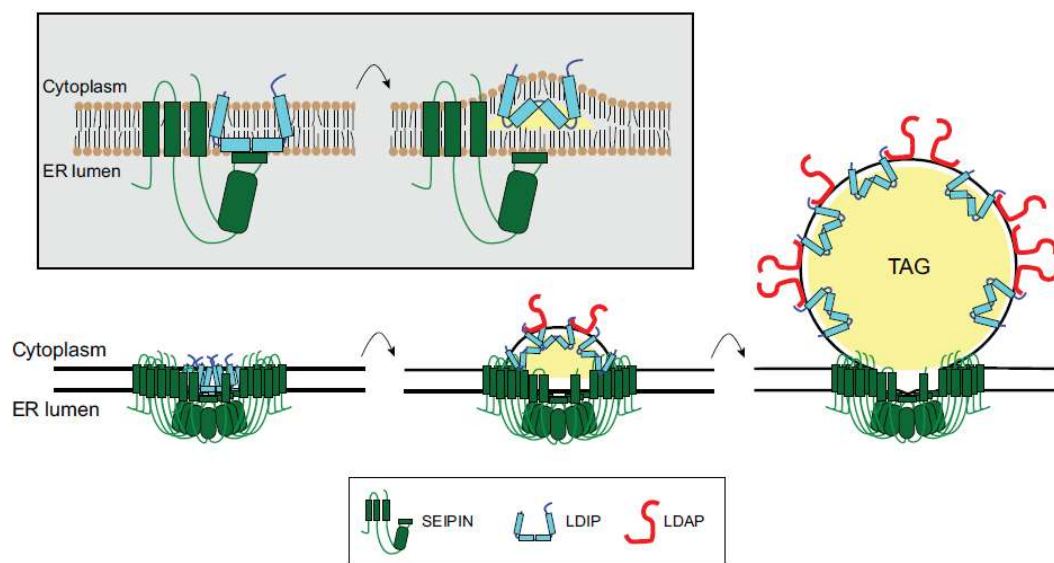
**Figure 26 : Modèle d'interaction entre la Seipin et LDAF1 dans le bourgeonnement de la gouttelette lipidique chez l'Homme.** D'après Chung et al., 2019.

### 3.2 LDIP chez *Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis thaliana*, une protéine semble très similaire à LDAF1 de par sa localisation et son comportement lorsque la Seipin est surexprimée. Il s'agit de la protéine LDIP (pour [LDAP]-interacting protein) qui recouvre également la surface de LD (Coulon *et al.*, 2020a) et dont la localisation au RE

dans un système surexprimant Seipin a été mis en évidence (Pyc *et al.*, 2021). LDIP interagit également avec la Seipin *via* le domaine luménal, tout comme LDAF1 et, en cas de stœchiométrie 1:1, augmente fortement le nombre de domaines transmembranaires créant également une zone très hydrophobe permettant de concentrer les TAGs.

En comparaison au modèle animal Seipin/LDAF1 où les deux protéines se dissocient par une contrainte mécanique exercée par les TAGs (Pyc *et al.*, 2017, 2021), montrent qu'une autre famille de protéines, les LDAP (« Lipid Droplet Associated Protein »), intervient en support pour dissocier LDIP de Seipin et pour stabiliser LDIP à la surface de la LD.



**Figure 27 : Modèle d'interaction entre la Seipin, LDIP et LDAP dans le bourgeonnement de la gouttelette lipidique chez *Arabidopsis thaliana*.** Pyc *et al.*, 2021.

Etant donné les similarités fonctionnelles qui ont été mises en évidence entre Seipin/LDAF1 chez l'Homme et Seipin/LDIP chez les plantes, il est probable que des homologues fonctionnels des LDAP existent également chez l'Homme. Ainsi, par homologie de séquence (Pyc *et al.*, 2021), montrent que les protéines de la famille des perilipins sont les homologues les plus significatifs chez l'Homme (PLIN5 avec la plus forte probabilité 96,8% puis les isoformes PLIN1-4) et proposent donc qu'elles se comportent comme des homologues fonctionnels des LDAP chez les mammifères.

#### 4 Vers un modèle de fonctionnement de la Seipin ?

Depuis sa découverte, le rôle de la Seipin intrigue au point qu'elle a été qualifiée plusieurs fois de « protéine mystérieuse » (Agarwal and Garg, 2004; Salo, 2023). En effet, bien que son implication dans la biogénèse des LD soit clairement mise en évidence à l'échelle cellulaire, sa compréhension atteint un niveau de complexité supérieure à l'échelle tissulaire ou de l'organisme entier. Le meilleur exemple est donné chez l'Homme dans le cas de la maladie de Berardinelli-Seip où les patients



souffrent d'une absence quasi-totale de tissus adipeux. Paradoxalement, à l'échelle cellulaire, la mutation de la Seipin n'empêche pas la formation des gouttelettes lipidiques mais perturbe leur site de biogénèse, leur morphologie et très certainement le devenir de la gouttelette dans la cellule en tant qu'organite dynamique. La différenciation cellulaire notamment des pré adipocytes en adipocytes matures est également dérégulée par la mutation.

D'un point de vue mécanistique, la Seipin semble « explorer » en quelque sorte la surface du réticulum endoplasmique pour s'immobiliser sur des sites membranaires propices à la formation de la LD. Ces sites sont certainement riches en molécules neutres comme les TAG, reconnus par les régions hydrophobes de la Seipin. Des modélisations bio informatiques soutiennent que la Seipin permet de concentrer et de capturer en quelque sorte les TAG (Zoni *et al.*, 2021). Il est estimé biophysiquement qu'une membrane peut accumuler jusqu'à 2,8% de TAG avant saturation (Hamilton and Small, 1981). Lorsque Seipin recrute d'autres protéines membranaires comportant des domaines hydrophobes comme LDAF1 (Homme) ou bien LDIP, ce niveau de saturation augmente et permet sûrement d'accumuler davantage de TAG. La tension de surface de la membrane est alors modifiée par cette accumulation qui s'accompagne probablement d'une composition locale en phospholipides membranaires spécifiques. La LD peut alors émerger du RE par une « ouverture » de la cage formée par les domaines TM de la Seipin. Les protéines (LDAF1/LDIP) recrutées au stade précoce de la formation de la LD viennent ensuite structurer la surface de la LD *via* la Seipin. La Seipin apparaît alors comme un coordinateur majeur de ces acteurs moléculaires, dont certains sont encore très certainement non identifiés.

Cependant, le volet biogénèse strict de la biogénèse LD a trop souvent été considéré dans de nombreux travaux sur la Seipin. Plusieurs aspects suggèrent que le rôle de la Seipin ne se limite pas uniquement à la biogénèse de la LD et soulignent son implication dans la mobilité de la LD et sa liaison au cytosquelette, dans son héritabilité au cours de la division cellulaire, dans la dégradation des TAG de la LD via la lipolyse, où dans la mise en place de sites de contacts entre organites, notamment entre le RE et la mitochondrie. Les futurs travaux menés sur la Seipin doivent ainsi prendre en compte tous ces aspects de la vie de la LD et considérer avec attention les multiples rôles directs ou indirects de la Seipin.

# Résultats

## Chapitre 1 : Analyses structurales et phylogénétiques de la Seipin de *Phaeodactylum tricornutum*



## Préambule

La protéine Seipin (annotation génétique Phatr3\_J47296) a été identifiée par homologie de séquence protéique chez *Phaeodactylum tricornutum* par (Lu *et al.*, 2017). Leurs analyses *in silico* se sont toutefois limitées à une analyse phylogénétique sommaire de par le nombre d'espèces et la diversité des phylums considérés. Dans cette première partie, nous apportons des éléments supplémentaires renforçant l'identification du gène Phatr3\_J47296 comme gène codant la protéine Seipin chez *Phaeodactylum tricornutum* (notée ci-après *PtSeipin*). Comme la Seipin présente un faible degré de conservation au niveau de la séquence protéique mais une très bonne conservation dans les structures déjà élucidées chez l'Homme, la drosophile ou la levure, nous nous sommes intéressés en premier lieu à ces éléments de structure. Nous avons montré par des approches prédictives que *PtSeipin* présentait des caractéristiques structurales similaires aux Seipins homologues identifiées chez les autres organismes. Nous complétons ensuite ces analyses en présentant des éléments uniques retraçant l'histoire évolutive de la Seipin chez *Phaeodactylum tricornutum*, les diatomées et plus largement dans le groupe phylogénétique des SAR (Straménopiles, Alvéolés, Rhizaria).

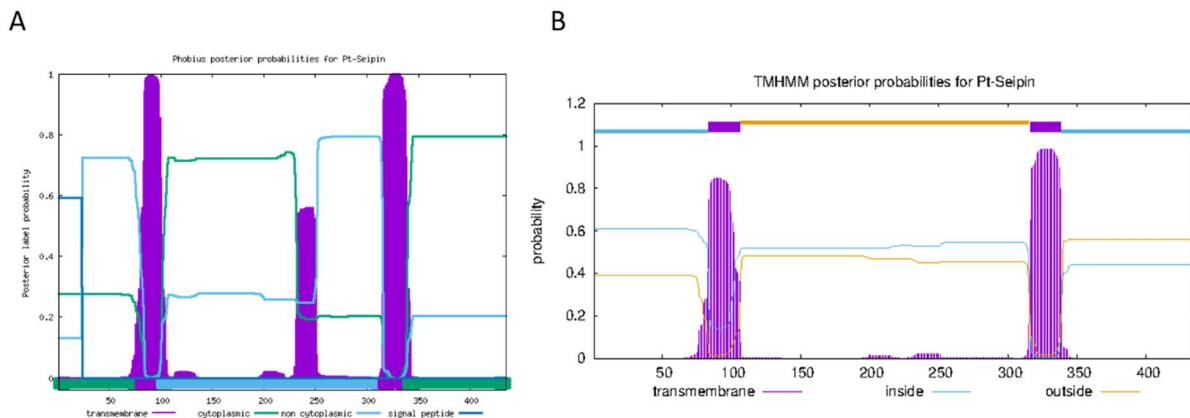
### 1 Analyses *in silico* de la structure de *PtSeipin*

#### 1.1 Analyses de la structure de *PtSeipin*

Plusieurs structures de protéines Seipins ont été résolues par Cryo-EM chez l'Homme, la drosophile et la levure (*cf.* La protéine Seipin, partie 2, p78). Dans cette partie, nous avons tiré avantage des outils de prédictions de structure de protéines basés sur des algorithmes utilisant l'intelligence artificielle. L'utilisation de ces outils est actuellement en pleine expansion : en août 2022, des millions de structures protéiques prédites par AlphaFold (DeepMind) ont été rendues publiques. Les analyses *in silico* dont les résultats sont présentés ici, ont été réalisées en utilisant la séquence protéique de *PtSeipin* accessible sur les bases de données publiques Ensembl Protist (Phatr3\_J47296) et Uniprot (B7G3W8) ainsi que sur la structure prédite par AlphaFold disponible dans la base de données (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

##### 1.1.1 *PtSeipin* est une protéine transmembranaire

Une des caractéristiques majeures de la protéine Seipin est son organisation transmembranaire associée au réticulum endoplasmique démontrée dans de nombreuses études (Lundin *et al.*, 2006; Perktold *et al.*, 2007; Szymanski *et al.*, 2007) (*cf.* 2.1 de la présente partie). Deux domaines transmembranaires confinent ainsi les extrémités N et C terminales du côté cytoplasmique alors qu'une partie importante de la protéine est localisée dans le lumen du RE que l'on qualifie de domaine luminal (Lundin *et al.*, 2006).



**Figure 28 : Prédiction de domaines transmembranaires pour la Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* associés à un domaine central non cytoplasmique.** (A) Prédiction des domaines transmembranaires et de signal peptide obtenus par Phobius. Le graphique des probabilités postérieures est représenté entre 0 et 1 sur l'axe des ordonnées et le graphique de la meilleure prédiction est représenté entre 0 et -0,04. Les domaines transmembranaires sont en violet, les parties cytoplasmiques et non cytoplasmiques respectivement en vert et en bleu clair. Un signal peptide est prédit avec une probabilité de 0,6. (B) Prédiction par TMHMM. Le graphique des probabilités postérieures est représenté entre 0 et 1 sur l'axe des ordonnées et le graphique de la meilleure prédiction est représenté entre 1 et 1,2. Les domaines transmembranaires sont en violet, les parties cytoplasmiques (outside) et non cytoplasmiques (inside) sont respectivement en jaune et bleu. *nb.* « outside cell » = lumen du RE/Golgi/lysosomes ; « inside » = intérieur de la cellule/cytosol.

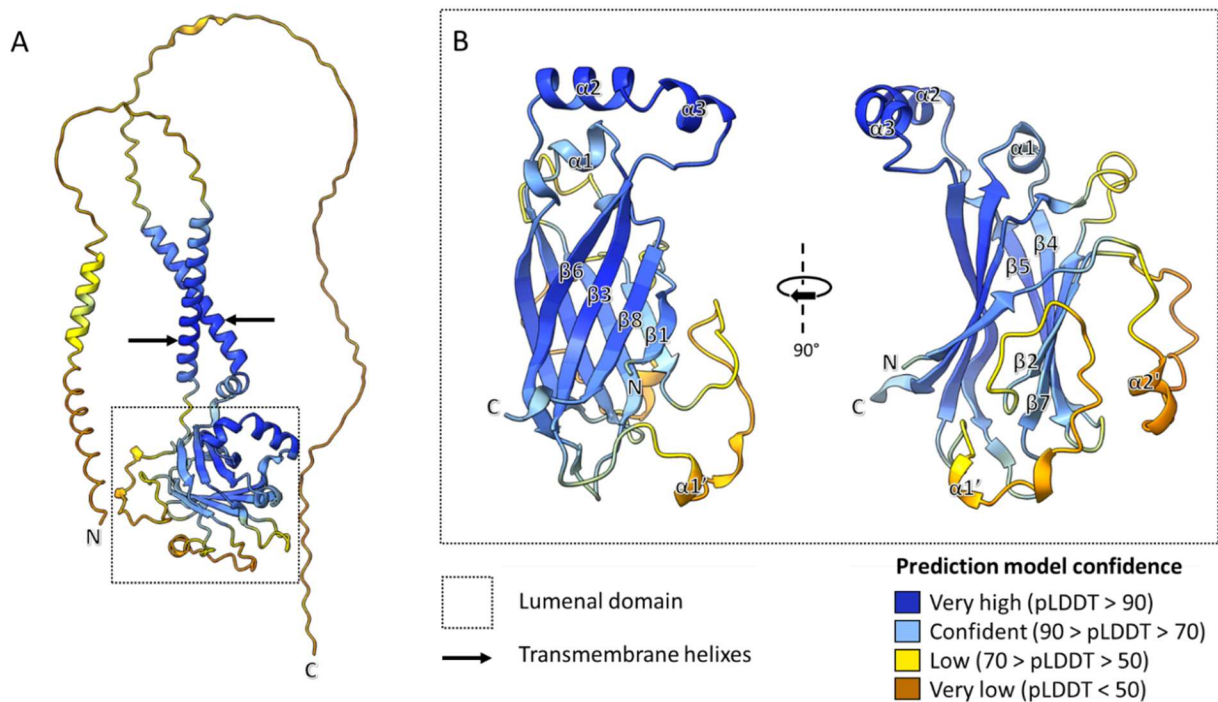
La **Figure 28** montre à l'aide de deux outils de prédictions différents, Phobius (Käll, Krogh and Sonnhammer, 2007) et TMHMM (Krogh *et al.*, 2001) que deux domaines transmembranaires sont présents chez *PtSeipin* avec une forte probabilité de prédiction. Entre ces deux domaines transmembranaires, une région non cytoplasmique est prédite. En revanche, les extrémités N et C terminales sont prédites comme cytosoliques. On note également qu'un troisième domaine transmembranaire est plus faiblement prédit (probabilité de 0,6 par Phobius, probabilité très négligeable par TMHMM) entre les deux domaines transmembranaires principaux, ne modifiant pas le caractère non cytoplasmique de cette région ; cette prédiction pourrait correspondre à une région plus hydrophobe sur laquelle nous reviendrons en détail plus loin (*cf.* Chapitre 1, partie 1.1.4, p94).

Enfin, la prédiction d'un signal peptide par l'outil Phobius laisse supposer que la protéine Seipin chez *Phaeodactylum tricornutum* soit adressée au réticulum endoplasmique comme montré chez d'autres organismes ; toutefois, un signal peptide peut également traduire un adressage à la membrane externe du plaste, qui se trouve en continuité avec le système endomembranaire nucléaire et réticulaire (*cf.* Introduction Diatomées, partie 3.2, p9).

### 1.1.2 Prédiction de structure par AlphaFold

La **Figure 29A** présente la prédiction de structure de *PtSeipin* sous sa forme monomérique. Elle met en lumière une fiabilité de prédiction plus ou moins élevée concernant certaines parties et permet de

positionner les uns par rapport aux autres, les domaines précédemment identifiés. Enfin, l'accent est porté plus particulièrement sur l'organisation et la structure tertiaire du domaine luminal.



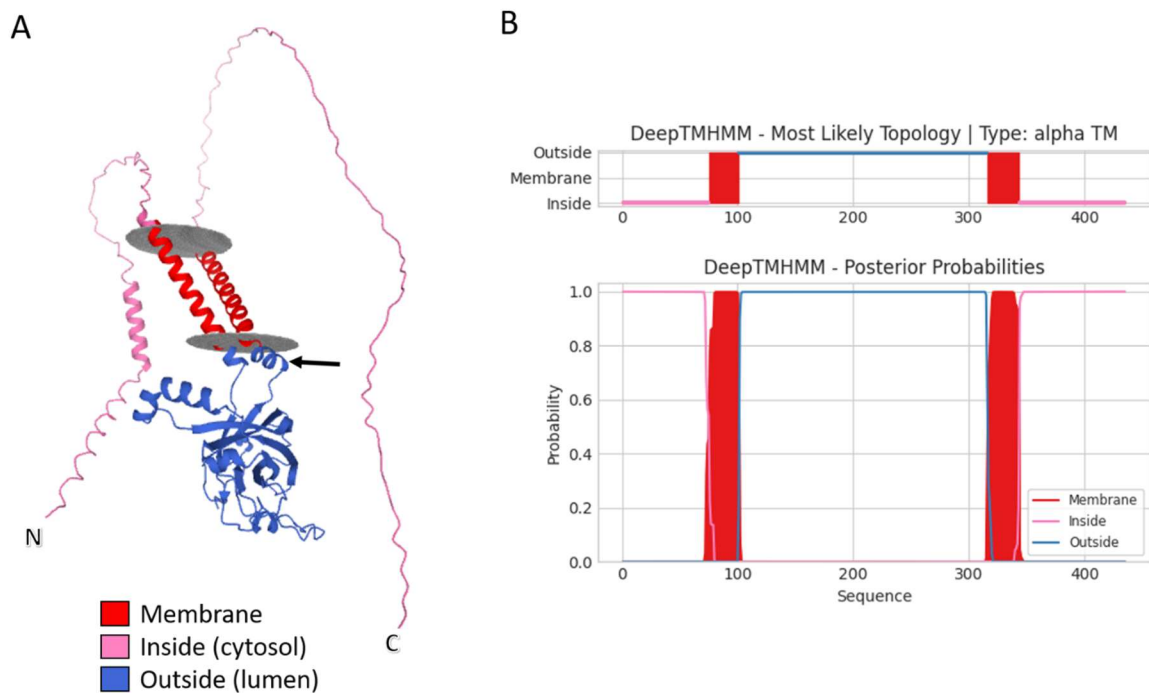
**Figure 29 : Prédiction de structure de *PtSeipin* par AlphaFold.** (A) Prédiction de la structure totale de la protéine. Les domaines transmembranaires identifiés partie 1.1.1 sont indiqués par une flèche tandis que la partie luminale est encadrée en pointillé. (B) Grossissement de la partie luminale uniquement. Les parties transmembranaires, N et C terminales ont été masquées. Les hélices  $\alpha 1$  à  $\alpha 3$  et les feuillets  $\beta 1$  à  $\beta 8$  composant la partie luminale ont été nommés de manière identique à ceux que l'on retrouve dans la structure de la Seipin de l'Homme (Yan *et al.*, 2018). Les hélices  $\alpha 1'$  et  $\alpha 2'$  représentées ici ne sont pas présentes chez l'Homme. Le gradient de couleur reflète la confiance de prédiction par résidu selon la métrique pLDDT (Jumper *et al.*, 2021b). La couleur bleue intense représente ainsi un score de confiance élevé et une prédiction de structure robuste, le marron foncé un score de prédiction faible et une structure peu fiable.

La partie luminale révèle un tonneau  $\beta$  central composé de 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles, en accord avec ce qui a été décrit pour les structures des Seipins de drosophile, humaine et de levure (Sui *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018; Arlt *et al.*, 2022). On retrouve entre certains de ces feuillets plusieurs hélices  $\alpha$ . Les hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  sont numérotées de manière identique à celles de la structure résolue chez l'Homme (Yan *et al.*, 2018), tandis que les hélices plus petites  $\alpha 1'$  et  $\alpha 2'$  présentes ici ne sont pas retrouvées chez l'Homme. Ces deux petites hélices sont dans des boucles pour lesquelles l'indice de confiance dans la prédiction de structure est assez faible ; leur présence est donc hypothétique. Un faible niveau de prédiction est également retrouvé au niveau des parties N et C terminales cytosolique qui apparaissent ici comme de longues boucles désorganisées, et pour lesquelles il n'est pas possible de prédire leur structure.

La structure prédite par AlphaFold permet ainsi d'identifier avec certitude que *PtSeipin* possède un tonneau  $\beta$  et des hélices  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ ), comparables avec les structures résolues par Cryo-EM.

### 1.1.3 Topologie d'insertion de *PtSeipin* dans la membrane

La combinaison de la prédiction de structure (AlphaFold) avec celle de la prédiction de domaines transmembranaires (DeepTMHMM) est possible grâce à l'outil bio-informatique Membrane Fold (Santiago Gutierrez *et al.*, 2022) permettant de visualiser les différents domaines directement sur la structure et de prédire son insertion dans la membrane (**Figure 30**).



**Figure 30 : Prédiction topologique de l'insertion de *PtSeipin* dans une membrane biologique.**

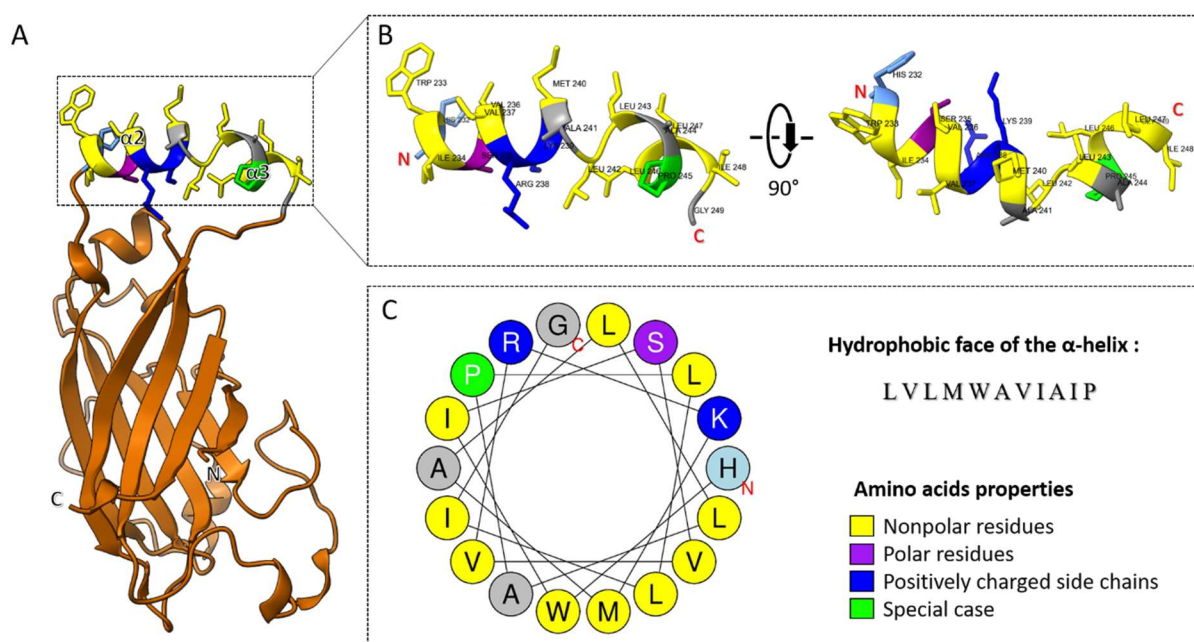
(A) : Prédiction par MembraneFold de la structure de la protéine et de son insertion dans la membrane. Les limites de la membrane sont représentées par les têtes polaires des lipides de la bicouche membranaire schématisés par les disques gris. (B) : prédiction de la topologie par DeepTMHMM. *nb.* « outside » = en dehors du cytosol soit dans le lumen du RE/Golgi/lysosomes ; « inside » = intérieur de la cellule/cytosol.

Les limites de la membrane biologique sont représentées par des disques gris sur la **Figure 30A** : les queues hydrophobes des lipides composant les deux couches de la membrane se font face et les têtes polaires des lipides se placent au niveau des disques gris. On constate également que l'hélice transmembranaire du côté C terminal forme un angle coudé qui semble se positionner directement sous la membrane (flèche noire, **Figure 30A**).

Comme précédemment décrit, la prédiction de structure n'est pas fiable pour les parties cytosoliques N et C terminales (score très faible, **Figure 29**). Il n'est donc pas exclu qu'elles se positionnent différemment de ce qui est proposé ici et que la topologie prédite ne reflète pas la réalité biologique.

### 1.1.4 Prédiction d'une hélice alpha hydrophobe

Les deux boucles  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  (**Figure 29B**) ont été identifiées comme des hélices hydrophobes ancrées à la membrane et fonctionnellement essentielles dans la formation des gouttelettes lipidiques (Sui *et al.*, 2018). Parce que ces hélices sont également présentes dans la structure de *PtSeipin*, nous avons cherché à identifier comment s'y organisent les acides aminés (**Figure 31**).



**Figure 31 : Prédiction de l'hydrophobicité des hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  dans la partie luminaire de *PtSeipin*.** (A) Seule la partie luminaire de *PtSeipin* est représentée. Les hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  sont encadrées. (B) Grossissement des hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ . La représentation moléculaire des acides aminés est affichée. Les couleurs utilisées correspondent aux propriétés chimiques telles qu'affichées dans l'encart (C). (C) Prédiction des propriétés de l'hélice (acides aminés His232 à Gly249) par l'outil HeliQuest. Les acides aminés non polaires sont affichés en jaune, les polaires et chargés positivement en violet et bleu.

La partie luminaire de *PtSeipin* est représentée (**Figure 31A**) avec une attention particulière portée sur les deux hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  dont les propriétés biochimiques ont été prédites par l'outil HeliQuest en soumettant la séquence des 18 acides aminés qui les composent. L'outil permet de prédire une face hydrophobe lorsqu'au moins 5 résidus hydrophobiques sont adjacents sur une hélice ce qui se révèle être le cas ici pour *PtSeipin* (**Figure 31C**). Une face entière hydrophobe est ainsi composée de huit acides aminés non polaires. On relève également que seulement deux acides aminés sont chargés, positivement (en bleu). De manière intéressante, ces résidus sont adjacents, et à l'opposé de la face hydrophobe.

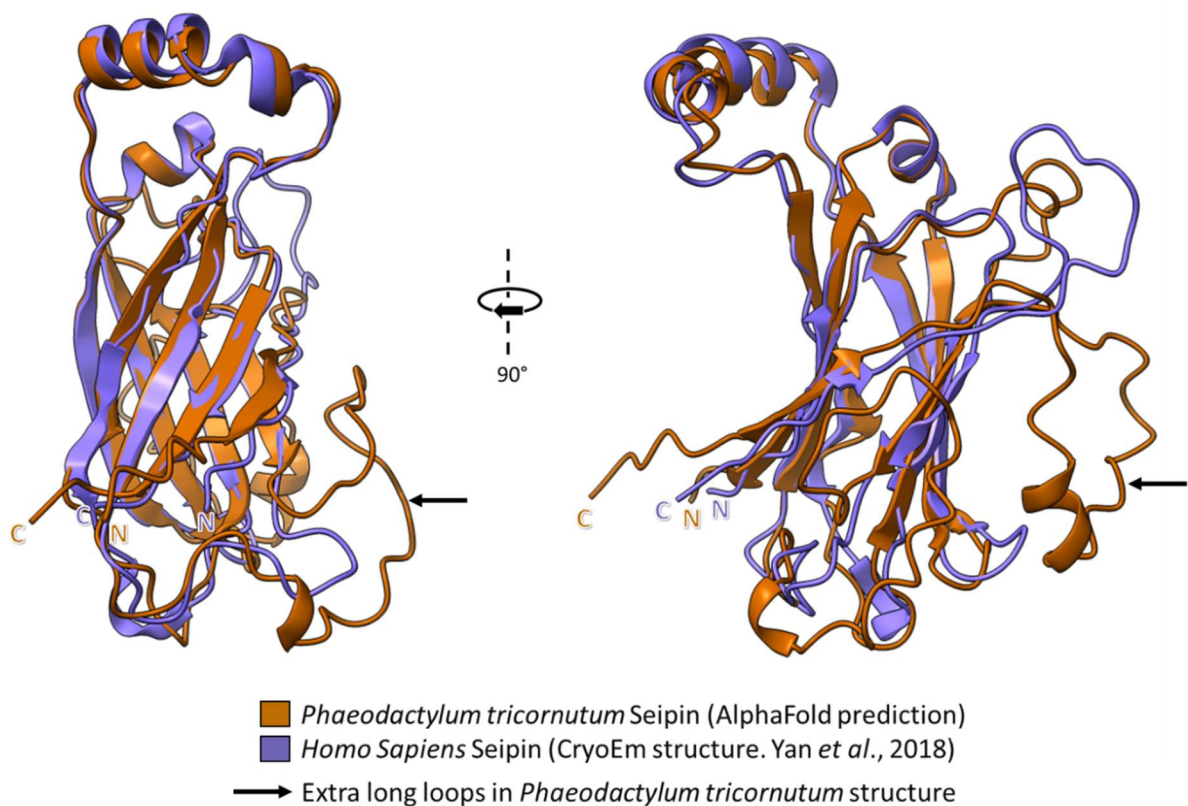
Cette analyse permet de compléter celle des domaines transmembranaires : l'outil Phobius prédisait notamment, avec une probabilité plus faible, une région transmembranaire dans la partie non cytosolique immédiatement en amont du 250ème acide aminé de *PtSeipin* (voir **Figure 28**). La face



fortement hydrophobe identifiée sur les hélices  $\alpha$  (nommée ci-après domaine HH pour « hélices hydrophobes ») comprend les acides aminés 232 à 249 et correspondrait à cette région transmembranaire prédite par Phobius.

#### 1.1.5 Prédiction de boucles non conservées

Alors que la majeure partie du domaine luminal de *PtSeipin* est prédite de manière relativement robuste, deux longues boucles situées de part et d'autre du feuillet  $\beta 2$  contiennent des petites hélices ( $\alpha 1'$  et  $\alpha 2'$ ) et présentent une prédiction de structure peu fiable (**Figure 29B**). La **Figure 32** montre la superposition des parties lumineuses de la structure prédite de *PtSeipin* et de la Seipin de l'Homme (*HsSeipin*) résolue par Cryo-EM (Yan *et al.*, 2018).



**Figure 32 : La protéine Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* révèle des boucles supplémentaires par rapport à la Seipin d'*Homo Sapiens*.** Les structures des domaines lumineux de *PtSeipin* (AlphaFold, en marron) et de *HsSeipin* (PDB 6DS5, en violet) ont été superposées. Les boucles supplémentaires présentes dans la Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* sont indiquées par des flèches.

La **Figure 32** montre que ces deux longues boucles ne sont pas présentes dans la structure de la Seipin de l'Homme, ni dans celle de la drosophile (non présentée ici par contrainte et soucis de clarté). Le reste de la structure (domaine HH et tonneau  $\beta$ ) se superposent quasiment à l'identique, renforçant le caractère exclusif de ces boucles chez *PtSeipin*.

## 2 Analyses des éléments structuraux spécifiques de *PtSeipin*

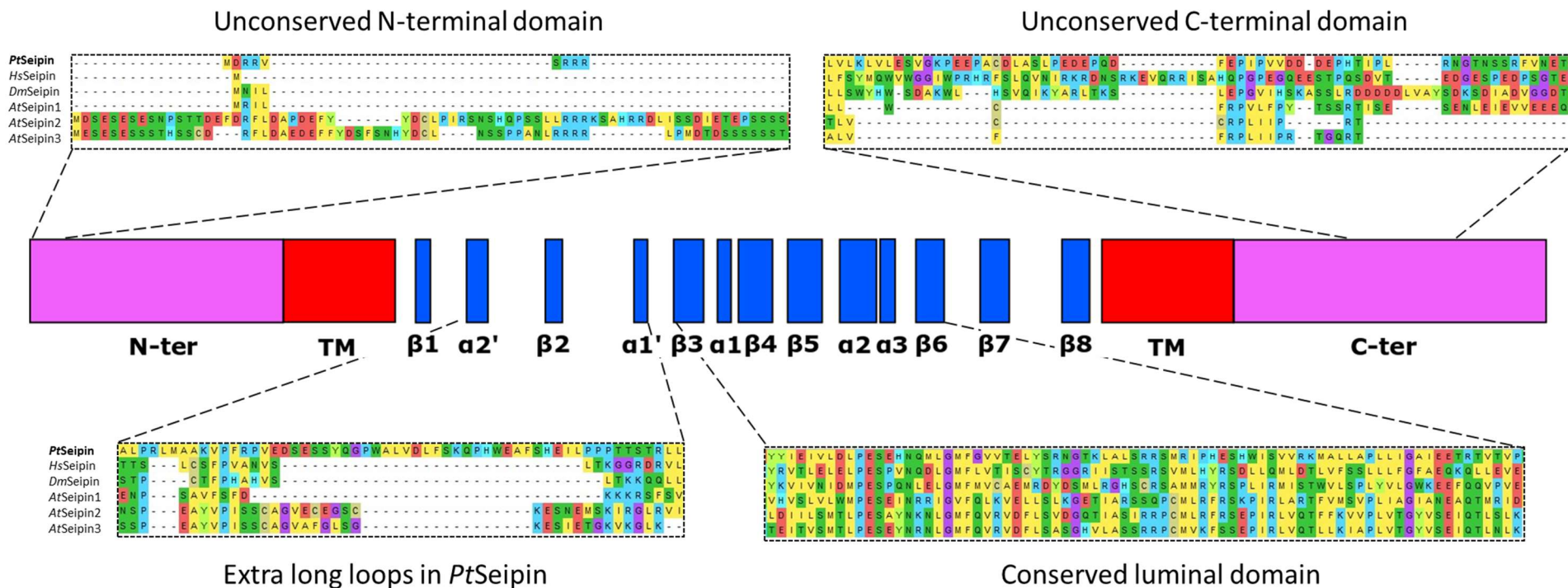
La structure prédite de *PtSeipin* présentée (cf. Chapitre 1, partie 1.1) met en évidence des caractéristiques communes et conservées avec les structures publiées comme c'est le cas pour les domaines transmembranaires, le domaine HH ou le tonneau  $\beta$ . En revanche, la structure met également en lumière certaines parties qui semblent propres à la Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* et qui ne sont pas retrouvées chez l'Homme, comme les boucles supplémentaires (**Figure 32**). Nous avons donc cherché à analyser plus en détail au niveau de la séquence protéique des caractères discriminants de *PtSeipin*.

### 2.1 Comparaison par alignements de séquences protéiques

Les séquences protéiques de la Seipin de l'Homme (*Homo sapiens*), de la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et des trois isoformes de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ont été alignées à celle de *Phaeodactylum tricornutum*. Seule des parties de séquences représentatives de ces alignements sont représentées (**Figure 33**). La séquence protéique de *PtSeipin* a été utilisée pour construire le schéma reflétant l'enchaînement des différentes parties (N et C terminales, domaines transmembranaires, feuillets  $\beta$  et hélices  $\alpha$ ). On constate ainsi que certaines parties sont très peu conservées entre phylum comme les parties N et C terminales. La partie N-ter est bien plus longue dans les isoformes 2 et 3 d'*A.thaliana* et la partie C-ter plus courte dans les 3 isoformes de la plante comparée aux autres espèces considérées ici.

On identifie également au niveau de la séquence protéique le motif d'acides aminés correspondant aux boucles supplémentaires présentées chez *PtSeipin* (**Figure 32**). Ces boucles encadrent le feuillet  $\beta_2$ . La deuxième boucle située entre le feuillet  $\beta_2$  et  $\beta_3$  est la plus longue.

Les alignements montrent également que la région luminale et centrale de la protéine comprenant l'enchaînement d'hélices hydrophobes (domaine HH, cf. Chapitre 1, partie 1.1.4 ) et des feuillets  $\beta$  sont relativement conservés au niveau protéique.



**Figure 33 : L’alignement de séquence de la Seipin entre plusieurs organismes révèle des parties relativement conservées et des parties non conservées.** Une représentation schématisée de l’enchaînement des parties qui composent la protéine Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* est montrée au centre de la figure. Les domaines cytosoliques N et C terminales sont représentés en rose, les domaines transmembranaires (TM) en rouge, les feuillets  $\beta$  et les hélices  $\alpha$  du domaine luminal en bleu. Les longueurs relatives de chaque domaine ont été respectées. De part et d’autres et encadrés en pointillés sont représentés des alignements de séquences protéiques de Seipin issues de différents organismes. De la première séquence à la dernière : *Phaeodactylum tricornutum* (*PtSeipin*), *Homo sapiens* (*HsSeipin*), *Drosophila melanogaster* (*DmSeipin*), *Arabidopsis thaliana* isoformes 1, 2 et 3 (*AtSeipin*1,2,3). Des alignements représentatifs des parties N- et C- terminales (haut) et du domaine luminal (bas) sont représentés.

### 3 Mise en perspective de la Seipin des diatomées dans l'arbre du vivant

Une comparaison des séquences des Seipins de nombreuses espèces représentatives d'une grande partie de l'arbre du vivant a été réalisée et les résultats sont présentés dans cette partie. Ce travail a nécessité l'identification de séquences de Seipins couvrant la diversité la plus importante possible. Le set initial de séquences a été utilisé pour une analyse phylogénétique préliminaire qui a permis d'affiner et de réduire le nombre de séquences pour en retenir 48 (travail réalisé avec Alberto Amato, LPCV, Grenoble). Ces séquences ont été utilisées pour des recherches de motifs conservés, ainsi que pour des analyses phylogénétiques poussées (collaboration avec Alberto Amato et Olivier Bastien, LPCV, Grenoble).

#### 3.1 Identification de motifs conservés

Les 48 séquences de Seipin ont été soumises à une analyse de conservation de motifs (outil d'analyse de conservation de motifs en ligne MEME <https://meme-suite.org/meme/>). La taille moyenne d'un motif répertorié dans la base de données spécialisées PROSITE est de 15,4 acides aminés (Hulo *et al.*, 2006). Une requête de 20 motifs d'une taille maximale de 20 acides aminés a donc été soumise, permettant d'être suffisamment large pour déceler des motifs conservés. Pour *PtSeipin* d'une taille totale de 435 acides aminés chaque motif couvre moins de 5% de la séquence totale.

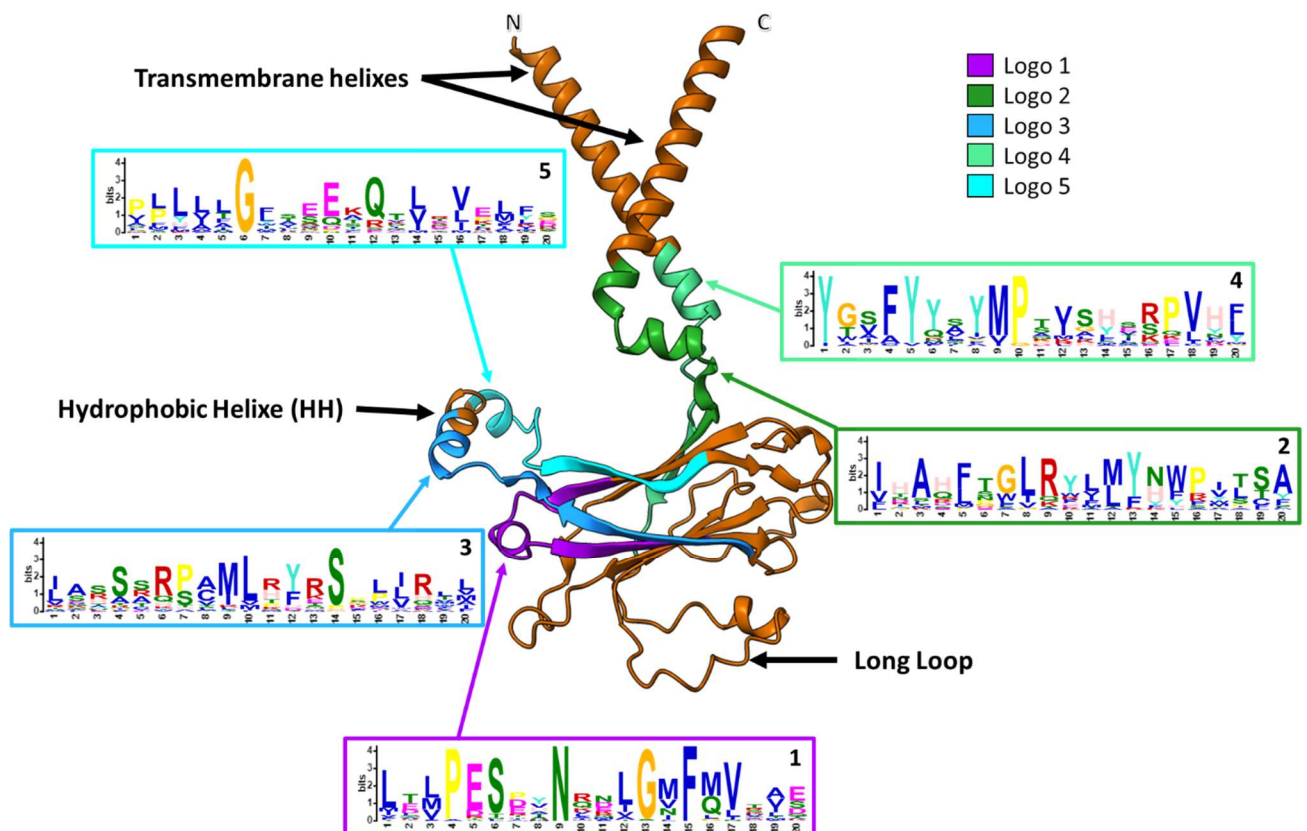
**Tableau 2 : Liste des motifs identifiés dans les 48 séquences de Seipin par le logiciel en ligne MEME et significativement présents chez *PtSeipin*.** Seule la séquence consensus du motif est reportée ici. Sur le premier motif, la séquence « PESxxN » extrêmement conservée est mise en évidence en gras.

Motif	Séquence consensus	E-Value	Nombre acides aminés	Présence nombre d'espèces	E-value chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
1	LTL <b>PESP</b> YNRNLGMFMVTAE	2.1e-354	20	43	2.68e-17
2	IHAHFTGLRYLMYNWPITSA	2.1e-217	20	31	5.54e-11
3	IASSRPAMLRYSPLIRLL	1.1e-205	20	43	3.66e-9
4	YGSFYYSYMPTSHSRPVHF	1.7e-164	20	23	5.06e-12
5	PLLLGFSEEKQTLRVELFS	2.7e-149	20	44	4.46e-11

Le **Tableau 2** montre les cinq premières séquences consensus de motifs protéiques présents dans la Seipin de *P.tricornutum*. On constate que les motifs conservés (**Figure 34**) concernent des régions précises de la Seipin ; deux motifs (2 et 4) sont à la base des hélices transmembranaires incluant le coude formé par l'hélice du côté C terminal et englobant également une partie des feuilletts  $\beta$  dans la continuité des hélices. Deux autres motifs (3 et 5) couvrent la quasi-totalité de l'hélice hydrophobe

(domaine HH) suggérant un rôle fonctionnel essentiel. Le motif 1 qui est également celui dont la conservation semble la plus significative, recouvre l'hélice  $\alpha_1$  ainsi que les deux feuillets  $\beta$  qui l'encadrent. Dans ce motif, nous avons identifié les résidus Proline 193 (P), Acide Glutamique 194 (E), Sérine 195 (S) et Asparagine 198 (N) définissant la séquence consensus « PESxxN » (**Tableau 2**). De façon intéressante, la Proline 193, premier acide aminé du motif conservé « PESxxN », peut établir une liaison hydrogène avec l'Arginine 226 du monomère adjacent (voir **Figure 36** et **Tableau 3**).

Ce petit motif est à cheval entre la fin du feuillet  $\beta_3$  (Proline193) et le milieu de l'hélice  $\alpha_1$  via l'Asparagine198. Lorsque l'on soumet ce motif à l'outil de comparaison de motifs Tomtom (Gupta *et al.*, 2007), aucun résultat significatif n'est retourné et il n'est donc pas possible de déduire un rôle fonctionnel par comparaison avec d'autres polypeptides.



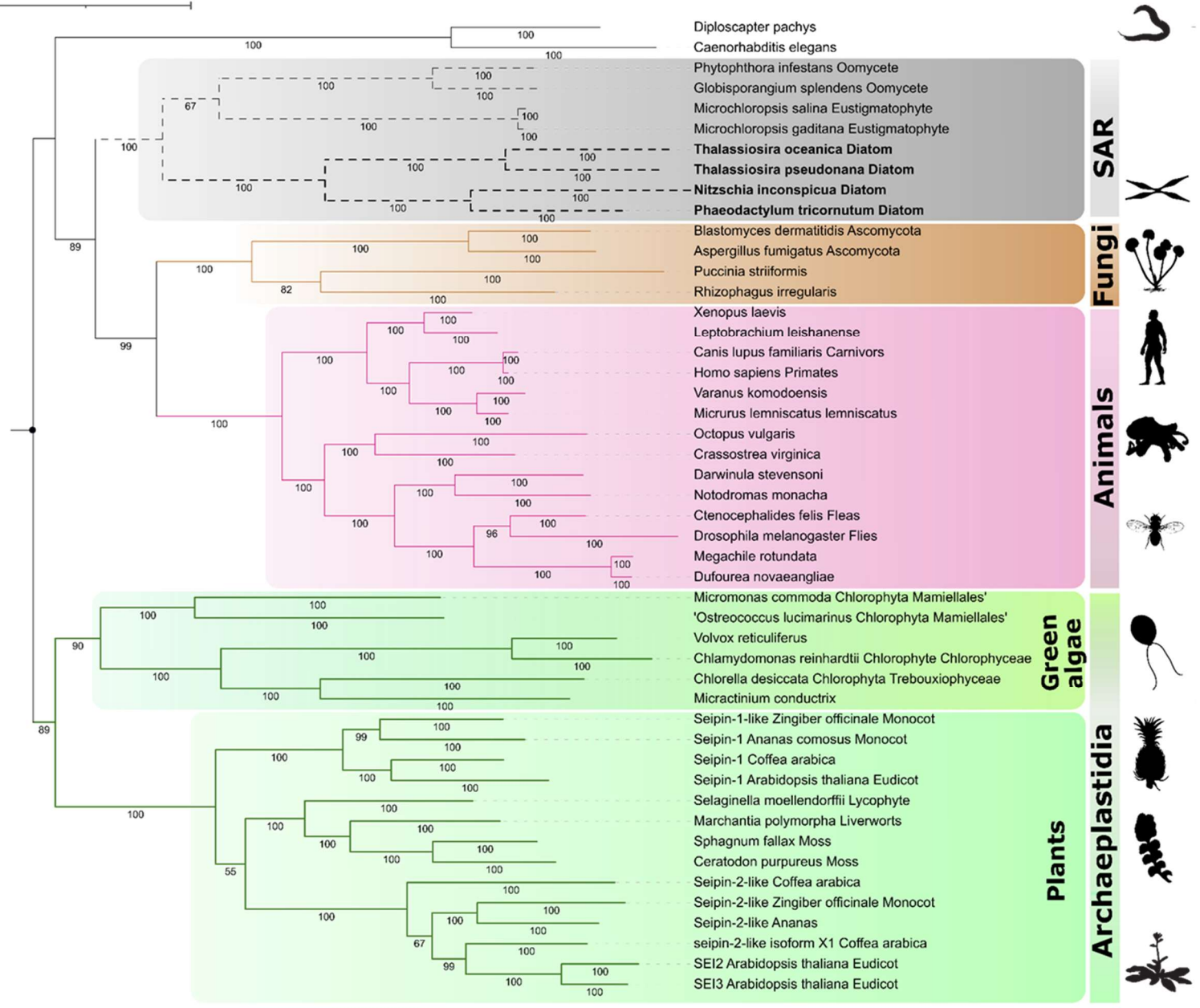
**Figure 34 : Position des 5 premiers motifs (logo) identifiés sur la structure de *PtSeipin*.** Les cinq motifs identifiés **Tableau 2** sont mis en évidence en couleur avec le logo correspondant est affiché. Les hélices transmembranaires, les hélices hydrophobes et la longue boucle sont indiquées par des flèches noires.

### 3.2 Phylogénie moléculaire

Dans les travaux de Lu *et al.*, 2017, une phylogénie des Seipins incluant celle de *Phaeodactylum* était proposée. Les auteurs placent *PtSeipin* à proximité des séquences de plantes et éloignée de celles

des animaux. Néanmoins, la méthodologie employée (peu d'espèces impliquées, valeurs de bootstrap faibles, nombre de générations faibles) nous a conduit à réévaluer cette analyse. L'arbre phylogénétique présenté ici (**Figure 35**) est l'aboutissement de résultats préliminaires qui incluaient un nombre important de séquences de Seipin. Ces analyses nous ont permis d'éliminer des espèces qui étaient trop divergentes tout en conservant au possible au moins deux espèces par groupe. Un jeu de données final incluant 48 séquences de Seipin a ainsi été retenu et soumis à une analyse phylogénétique plus robuste (analyse bayésienne conduite sur 2 millions de générations).

Tree scale: 1



**Figure 35 : Phylogénie des protéines Seipin.** L'analyse phylogénétique inclut 48 séquences protéiques de Seipin réparties entre Archaeplastida (plantes et algues vertes), animaux, champignons et SAR (Straménopiles, Alvéolés et Rhizaires). Les différentes espèces de diatomées dont *Phaeodactylum tricorneratum* sont mises en évidence en gras.

Les valeurs de bootstrap (entre 0 et 100) sont indiquées à proximité des branches. Plus cette valeur est proche de 100, plus la prédiction de la branche est robuste.

L'arbre phylogénétique obtenu (**Figure 35**) révèle que les Seipins issues des plantes terrestres de certaines mousses et des algues vertes sont séparées de celles issues des Opisthocontes regroupant les animaux et les champignons. Au sein des *Archaeplastidia*, les Seipins des algues vertes sont séparées des plantes terrestres. Chez les plantes à fleur, les isoformes « Seipin1 » de *Coffea arabica*, *Arabidopsis thaliana* ou *Zingiber officinale* sont également séparées des isoformes « Seipin2 » suggérant une duplication du gène chez un ancêtre commun des plantes. L'identification d'un seul isoforme identifié chez les algues vertes soutient cette hypothèse.

Les Seipins issues des diatomées et des endosymbiotes secondaires sont phylogénétiquement plus proches des Seipins issues des animaux et champignons suggérant une origine commune. On peut ainsi supposer que suite à l'endosymbiose secondaire qui a été à l'origine de l'émergence des diatomées, la Seipin a été héritée de la cellule hôte et non pas de l'algue ingérée.

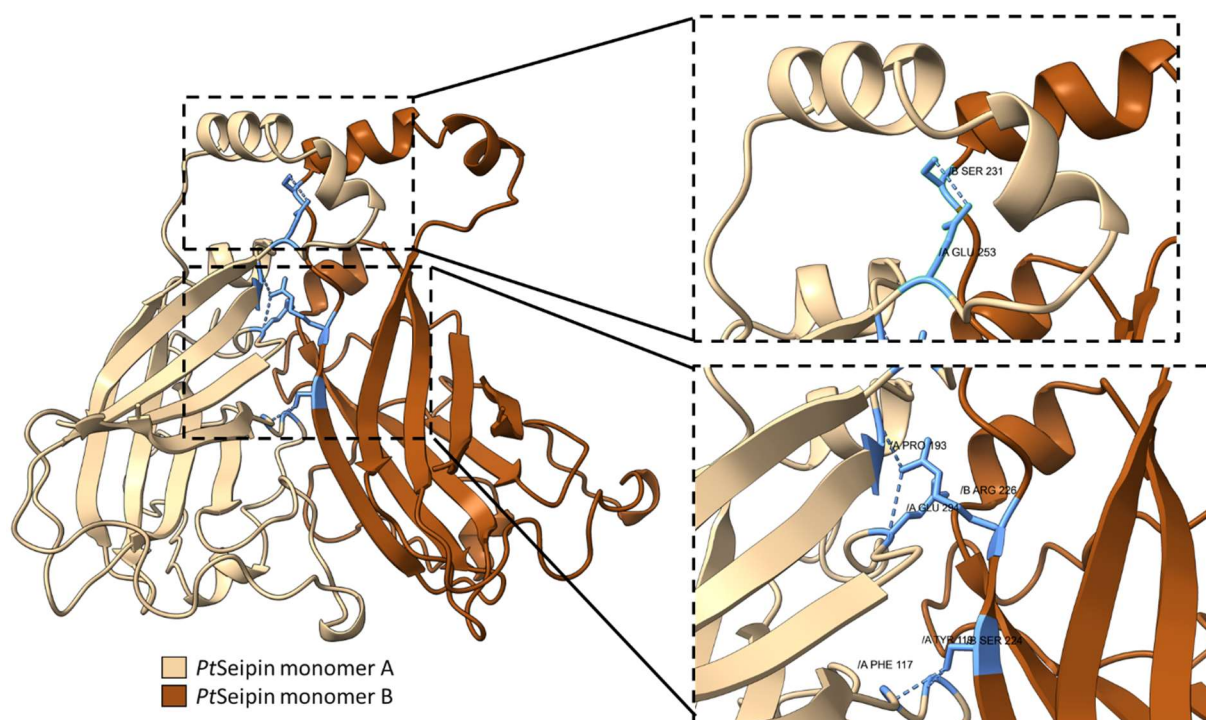
#### 4 Mise en évidence d'une oligomérisation de *PtSeipin*

Les structures résolues chez l'Homme, la drosophile ou la levure mettent toutes en évidence une oligomérisation de la protéine Seipin avec 10 à 12 monomères formant une structure tertiaire en forme d'anneau. Dans cette partie, nous apportons des éléments montrant que la Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* existe également sous forme d'oligomère.

##### 4.1 Prédiction d'une structure en dimère par AlphaFold-Multimer

Nous avons utilisé l'outil AlphaFold-Multimer (Richard Evans *et al.*, 2022) pour tenter de prédire une interaction éventuelle entre monomères de *PtSeipin*. Cinq modèles ont été prédits (pLDDT > 56). La partie luminale du dimère prédit avec le plus haut score est présentée sur la **Figure 36**.





**Figure 36 : Prédiction d’homo oligomérisation de deux monomères par la partie luminaire de la protéine Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* à travers des liaisons hydrogènes.** Chacune des sous-unités est représentée d’une couleur différente. Encarts : grossissements centrés sur les acides aminés pouvant être impliqués dans l’établissement de liaisons hydrogènes inter-monomères. Les acides aminés concernés et les liaisons hydrogènes associées sont représentés en bleu.

Tout d’abord, il est important de noter que la structure caractéristique du domaine luminaire de la Seipin est conservée lorsque l’on prédit sa dimérisation chez *Phaeodactylum tricornutum*. On constate ensuite que plusieurs acides aminés pourraient être impliqués dans la formation d’un dimère à travers l’établissement de liaisons hydrogènes entre les deux monomères qui le composent. Ces liaisons hydrogènes sont récapitulées dans le (**Tableau 3**). On note que certains de ces acides aminés se trouvent au niveau du tonneau  $\beta$  soit sur des feuillets, comme c’est le cas pour Ser224 sur le monomère B, soit sur des boucles entre deux feuillets (Phe117 et Tyr119 sur le monomère A).

Ces régions correspondent fidèlement au modèle de couplage évolutif (« evolutionary coupling ») proposé par Sui *et al.*, 2018, dans l’interaction entre deux monomères de Seipin. Le modèle qu’ils proposent permet d’identifier des interactions conservées au cours de l’évolution entre paires d’acides aminés et qui peuvent contribuer à la stabilité structurelle des protéines. On identifie notamment, deux positions dont l’interaction semble commune entre leur modèle et notre prédiction, 1) entre Glu253 (monomère A) et Ser231 (monomère B) et 2) entre Ser224 (monomère B) et Phe117/Tyr119 (monomère A).

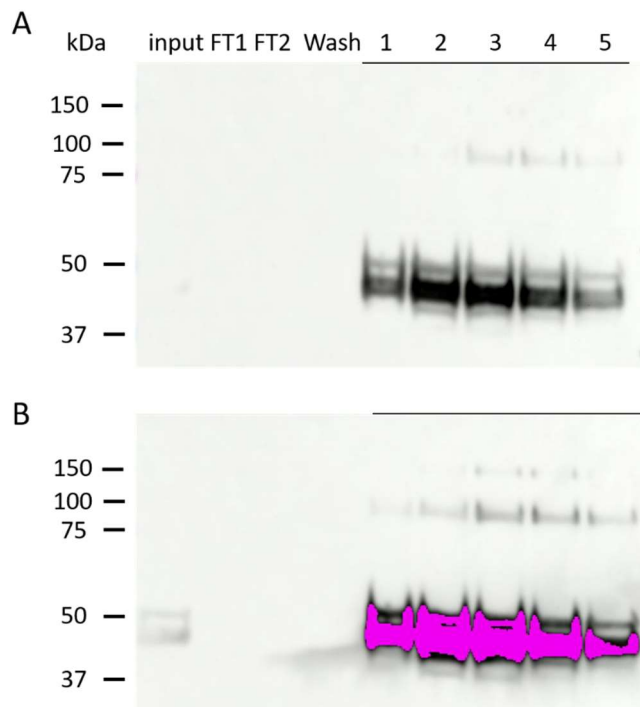
On constate que ces mêmes régions ont été identifiées dans l'interaction entre deux monomères de Seipin humaine par Yan *et al.*, 2018 ; cependant, les auteurs mettent en avant une troisième interface d'interaction au niveau des domaines HH que nous n'avons pas pu prédire ici.

**Tableau 3 : Paires d'acides aminés pouvant être impliqués dans l'établissement de liaisons hydrogènes entre deux monomères adjacents de Seipin chez *Phaeodactylum tricornutum*.**

Résidu sur monomère A	Résidu sur monomère B	Distance de la liaison H
Glu 253	Ser 231	2.885Å
Phe 117	Ser 224	2.153Å
Tyr 119		2.931Å
Glu 294	Arg 226	3.560Å
Pro 193		3.034Å

#### 4.2 Détection d'oligomères de PtSeipin après expression en système *in vitro*

La protéine PtSeipin a été exprimée *in vitro* en système « cell free » sur la plateforme de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (expression supervisée par Lionel Imbert, *cf.* Matériel et Méthodes, partie 7.2, p232). Le produit de purification a été contrôlé par migration sur gel de polyacrylamide et immunodétection sur membrane de nitrocellulose (**Figure 37**).



**Figure 37 : Observation de multimères de PtSeipin après migration sur gel de polyacrylamide.** Cinq fractions correspondant aux différentes étapes de la purification de PtSeipin exprimée *in vitro* sur colonne de Nickel (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 7.2, p232) ont été déposées sur un gel de polyacrylamide (SDS-Page). « Input » : sortie de colonne après chargement de l'échantillon. « FT1 et 2 » : deuxième et troisième chargements de l'échantillon sur la colonne. « Wash » : lavage de la

colonne. « 1 à 5 » : fractions d'éluion. La membrane a été révélée avec un anticorps anti-histidine. La membrane a été révélée selon deux modes d'expositions différents.

La **Figure 37A** montre que la protéine produite, couplée à une étiquette ou un tag histidine avec un poids moléculaire attendu de 49kDa est correctement éluee après purification sur la colonne. Une autre bande de poids moléculaire légèrement supérieure apparaît juste au-dessus de la bande la plus intense.

Une bande supplémentaire d'intensité plus faible est révélée à un poids moléculaire de 100kDa, soit le double du poids moléculaire d'un monomère (**Figure 37A**). Lorsque l'on augmente davantage le temps d'exposition jusqu'à saturation du signal à 50kDa, une troisième bande est visible à 150kDa, soit trois fois la taille d'un monomère (**Figure 37B**). Il semble donc qu'au moins 3 monomères de *PtSeipin* puissent s'homo-oligomériser *in vitro* de manière autonome.

## 5 Discussion et conclusions du Chapitre 1

Les travaux présentés dans ce chapitre portent sur l'étude *in silico* et *in vitro* de la protéine Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* sur plusieurs aspects : structure tertiaire, identification de motifs conservés, phylogénie et interaction entre monomères. Les études structurales, bien que basées uniquement sur des outils de prédiction reposant sur des méthodes d'intelligence artificielle, montrent des points de convergence et des différences avec les structures d'autres Seipins résolues en Cryo-EM.

*PtSeipin* est ainsi prédite comme une protéine transmembranaire possédant, en outre, un peptide signal, ce qui suppose son adressage à certains compartiments cellulaires. Par contraste avec les cellules eukaryotes de mammifères, d'insecte ou de levure, les cellules de diatomées possèdent une organisation intracellulaire et une architecture membranaire bien plus complexe. La présence d'un plaste volumineux dans la cellule en est un premier élément. Celui-ci est limité par quatre membranes dont la plus externe est physiquement connectée au système endomembranaire, et est en particulier continu avec la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (appelée EpM ou cERM selon les auteurs Flori *et al.*, 2016; Lupette *et al.*, 2019). Ainsi, la Seipin chez *P.tricornutum* pourrait être adressée soit à la membrane EpM soit au réticulum endoplasmique. Il n'est pas exclu qu'elle puisse se déplacer depuis la membrane du réticulum par diffusion latérale, migrant ainsi jusqu'à la membrane la plus externe du plaste. La proximité de certaines LD avec le plaste, parfois observées à travers des sites de contacts (Lupette *et al.*, 2019) ou bien même coiffant la gouttelette produite en carence nutritionnelle (Leyland *et al.*, 2020) pourrait être cohérente avec une localisation périplastidiale de la Seipin. L'étude de la localisation de *PtSeipin* a été réalisée après expression d'une protéine fusionnée avec la GFP et les résultats sont exposés et discutés dans le Chapitre 2.

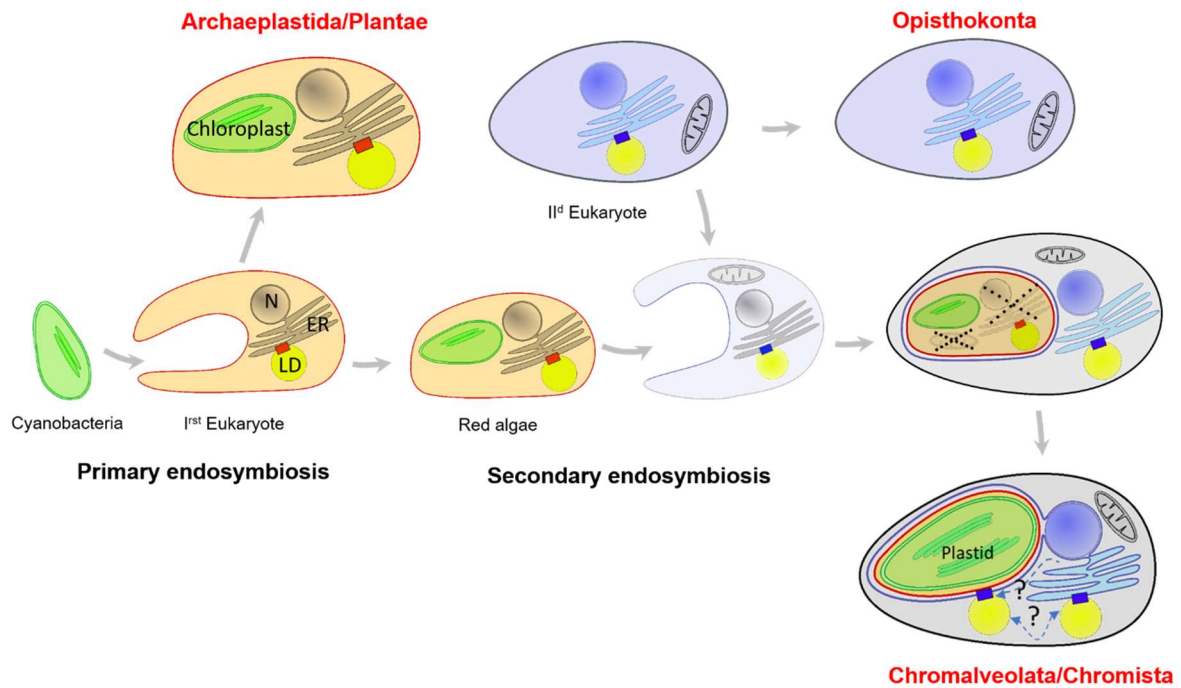
De manière générale, la protéine Seipin est très peu conservée au niveau de sa séquence primaire, mais fortement conservée au niveau de la structure tertiaire pour le domaine luminal et dans une moindre mesure pour les domaines transmembranaires. Nous avons pu vérifier que *PtSeipin* présentait une structure tridimensionnelle prédite se superposant parfaitement avec celle de l'Homme (et de la drosophile, non présentée ici) pour les hélices hydrophobes (domaine HH), les résidus hydrophobes orientés vers la membrane ainsi que pour l'enchaînement de feuillets  $\beta$  antiparallèles organisés en un tonneau. Nous avons pu identifier deux boucles supplémentaires dont une particulièrement longue en nombre d'acides aminés (30 acides aminés). Ces boucles supplémentaires sont structurellement mal prédites tout comme les parties N et C-terminales cytosoliques. On peut supposer que ces régions correspondent à des domaines intrinsèquement désordonnés nécessitant des partenaires moléculaires particuliers, ou bien un environnement biochimique précis afin de s'organiser structurellement.

Nous avons également pu prédire l'homo dimérisation de *PtSeipin*. La position relative des domaines luminaux de deux monomères est parfaitement similaire entre la prédiction (**Figure 36**) et les structures publiées chez la drosophile et l'Homme (Sui *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018). Une analyse poussée des résidus impliqués dans la dimérisation a été réalisée par Sui *et al.*, 2018, couplant des données structurales de Cryo-EM à un modèle basé sur 1591 séquences protéiques de Seipin. Le modèle d'interaction moléculaire met ainsi en lumière les résidus les plus conservés en terme d'évolution potentiellement impliqués dans la dimérisation. De façon cohérente, les interactions hydrogènes que nous avons identifiées (**Figure 36, Tableau 3**) suivent un schéma semblable.

L'analyse par électrophorèse de la protéine exprimée *in vitro* montre un signal au poids moléculaire attendu pour un monomère de Seipin ainsi que des bandes d'intensités plus faibles à deux et trois fois cette valeur, soutenant la présence de dimères et de trimères. Ces résultats suggèrent également que la Seipin exprimée en dehors de son contexte cellulaire et ne bénéficiant pas des modifications post traductionnelles, est tout de même capable de s'auto oligomériser sans l'aide de partenaires protéiques supplémentaires. Une électrophorèse effectuée sur un gel dénaturant est supposée déstabiliser des interactions hydrogènes. Il est donc probable que des interactions plus fortes entrent en jeu et impliquent les régions transmembranaires et/ou N et C-terminales de *PtSeipin*. Nous avons tenté de faire migrer nos échantillons produits *in vitro* sur un gel non dénaturant (données non présentées) sans parvenir à faire pénétrer les protéines au sein du gel, laissant supposer la formation d'agrégats.

Enfin, nous avons réalisé une analyse phylogénétique plus poussée que celles proposées dans la littérature (Lu *et al.*, 2017; de Vries and Ischebeck, 2020) pour tenter de comprendre l'histoire

évolutive de la Seipin chez *P.tricornutum*, les diatomées et plus largement les endosymbiotes secondaires. Nous avons pu constater que les Seipin issues d'endosymbiotes secondaires dont les diatomées, sont groupées à proximité de celles des animaux et séparées des *Archaeplastida* (plantes et algues vertes). Cette observation suggère que le gène codant Seipin a été hérité à partir de la cellule eucaryote hôte au cours de l'endosymbiose secondaire (**Figure 38**).



**Figure 38 : Représentation schématique du scénario évolutif de la Seipin chez les Chromalvéolés (*P. tricornutum*).** Les rectangles rouges et bleus représentent la protéine Seipin.

**Chapitre 2 : Analyse fonctionnelle de la Seipin de**  
***Phaeodactylum tricornutum***

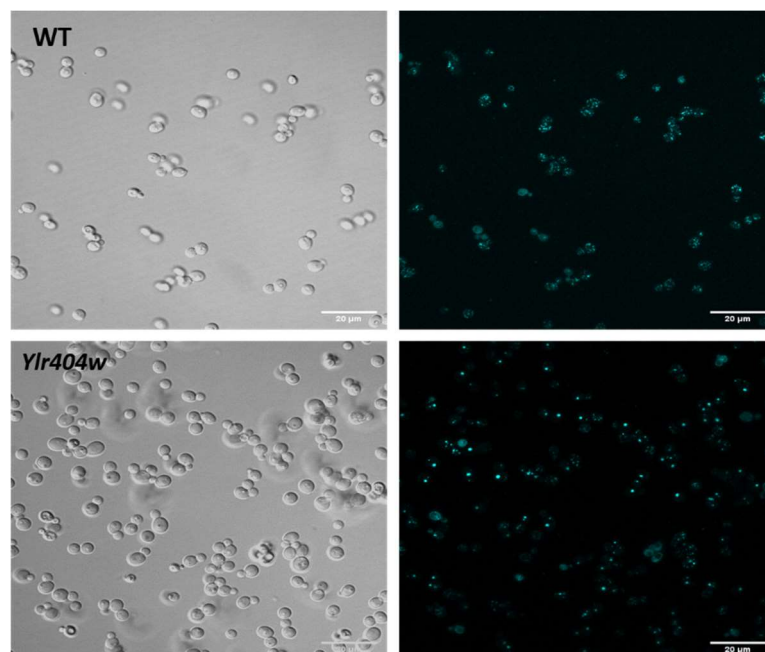


## Préambule

Les résultats présentés dans ce chapitre portent tout d'abord sur la caractérisation de la Seipin de *P.tricornutum* exprimée en système hétérologue (chez la levure *S.cerevisiae*). Nous avons ensuite cherché à déterminer la localisation de la Seipin *in vivo* chez *P.tricornutum* ainsi qu'à déterminer sa fonction. Pour cela, une analyse fonctionnelle de gène a été réalisée (analyse de lignée surexpresser et de lignée mutante invalidées génétiquement). Nous avons porté notre étude fonctionnelle sur des analyses microscopiques des LD des lignées mutantes, sur des paramètres physiologiques de croissance ainsi que sur l'étude du glycérolipidome total dans des conditions de cultures « normales » et dans des conditions de stress.

### 1 Complémentation fonctionnelle de levures invalidées génétiquement pour la Seipin

Les résultats présentés dans ce chapitre évaluent la capacité de la protéine Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* à restaurer le phénotype observé dans les lignées de levures invalidées génétiquement pour leur Seipin endogène codée par le gène *Fld1* – (lignées *Ylr404w*). Chez les lignées mutantes, les gouttelettes lipidiques (LD) décrites dans la littérature sont très affectées : leur nombre diminue tandis que leur taille augmente (Szymanski *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2008). Le gène *Fld1* (Few Lipid Droplets) tire son nom de ces observations (*cf.* Introduction La protéine Seipin, partie 1.1, p70). Dans nos expériences, les mutants présentaient des LD uniques et de tailles importantes par rapport au sauvage (**Figure 39**) en accordance avec la littérature.



**Figure 39 : Aspect des LD chez les mutants levures Seipin (lignées *Ylr404w*) comparé aux lignées sauvage dans nos expériences. Gauche : images de microscopie optique en champ clair. Droite : fluorescence des LD marquées au MDH.**



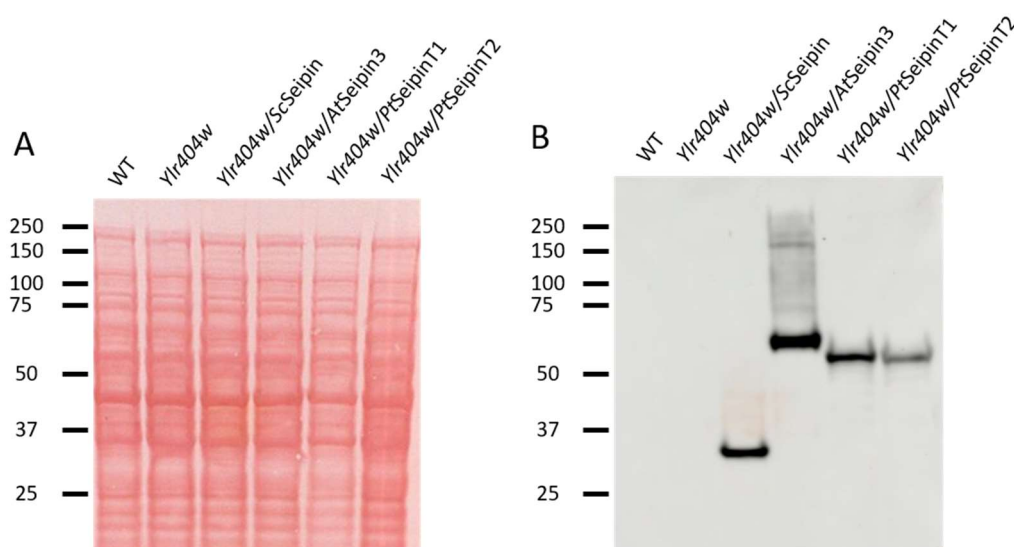
Les lignées de fond génétique *Ylr404w* ont été transformées pour exprimer trois Seipin provenant d'organismes différents : 1) le gène endogène de levure *Fld1* codant la Seipin (nommé ci-après *ScSeipin*) utilisé comme contrôle positif ; 2) l'isoforme 3 de la Seipin d'*Arabidopsis thaliana* (nommé ci-après *AtSeipin3*) choisie, car elle permet le mieux de restaurer le phénotype KO (en nombre de LD et en composition de TAG) dans la levure (Cai *et al.*, 2015) ; 3) la Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* (nommée ci-après *PtSeipin*) afin d'évaluer son degré de complémentation fonctionnelle.

### 1.1 Validation de l'expression protéique de Seipin in vivo

Les lignées complémentées par un isoforme de Seipin ou transformées par le vecteur vide *YCplac33* apportant la capacité de synthèse de l'Uracile (contrôle négatif) ont été cultivées pendant la nuit et récoltées en phase exponentielle (DO comprise entre 2 et 2,5). Les lignées exprimant *PtSeipin* ont montré un phénotype général légèrement différent des autres lignées complémentées par une croissance ralentie (*cf.* Chapitre 2, partie 1.2, p112). De ce fait, pour *PtSeipin*, les cellules ont respectivement été récoltées soit simultanément avec les autres lignées pour un même temps de culture (*PtSeipinT1*, DO<1) soit ultérieurement à DO similaire (*PtSeipinT2*, DO>2).

La **Figure 40** présente l'analyse du contenu protéique des lignées complémentées ou non. Les quantités totales de protéines marquées au rouge ponceau semblent équivalentes entre les différents échantillons, hormis pour *PtSeipinT1* et T2 dans lesquels les quantités de protéines chargées sur le gel semblent plus faibles ou plus importantes.

L'immunodétection par l'anticorps anti-HA révèle les poids moléculaires des protéines produites aux tailles attendues (voir **Figure 40**). On relèvera que l'intensité de la bande de *PtSeipinT2* est plus faible que celle de l'échantillon *PtSeipinT1* et ce, malgré une quantité de protéines totale plus importante.



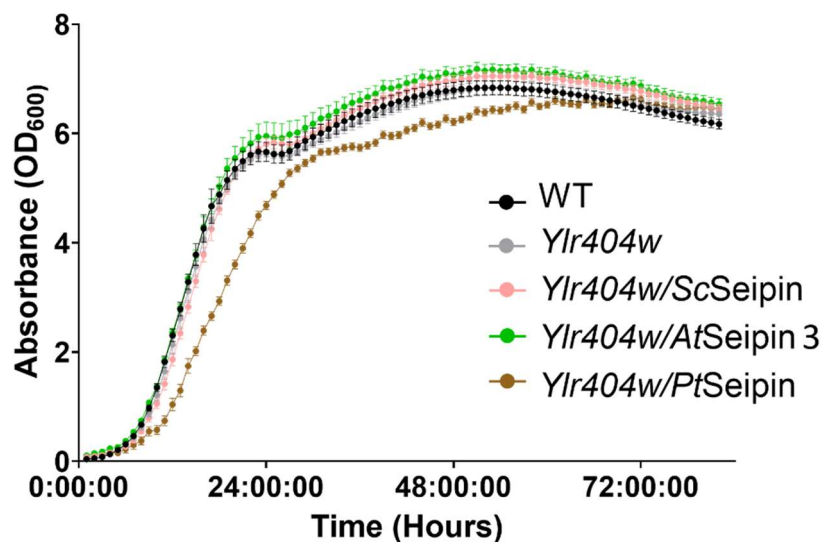
**Figure 40 : Expression de protéines Seipin hétérologues chez la lignée *Ylr404w* de *S.cerevisiae*.** L'échelle de poids moléculaire est en kilodalton (kDa). (A) : coloration au Rouge ponceau des extraits

totaux de protéine. (B) : Immunodétection de la membrane par anticorps Anti-HA. *WT* : lignée BY4741 transformée par YCplac33 (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 3.2.4, p217). *Ylr404w* : lignée KO pour le gene *Fld1* transformée par YCplac33. *ScSeipin* : Lignée de fond génétique *Ylr404w* transformée par le vecteur d'expression YCplac33-*Fld1* (poids attendu 36 kDa). *AtSeipin3* : Lignée de fond génétique *Ylr404w* transformée par le vecteur d'expression YCplac33-*AtSeipin3* (poids attendu 60 kDa). *PtSeipinT1* et *T2* : Lignée de fond génétique *Ylr404w* transformée par le vecteur d'expression YCplac33-*PtSeipin* (poids attendu 52 kDa), récoltée après un temps de culture identique aux autres lignées mais à une DO plus faible (*T1*) ou bien après un temps plus long, afin d'atteindre une DO de 2 (*T2*).

## 1.2 Croissance des levures complémentées

La croissance a été mesurée par lecture de l'absorbance à 600nm pendant 72h (**Figure 41**) après avoir inoculé les cellules à très faible concentration (DO=0,05).

Il apparaît que les cellules complémentées par *PtSeipin* ont une croissance cellulaire légèrement affectée (**Figure 41**) dès la sortie de phase de latence. Alors que la DO maximale est atteinte au bout de 48 heures pour les autres lignées, *PtSeipin* ne l'atteint qu'au bout de 72 heures.



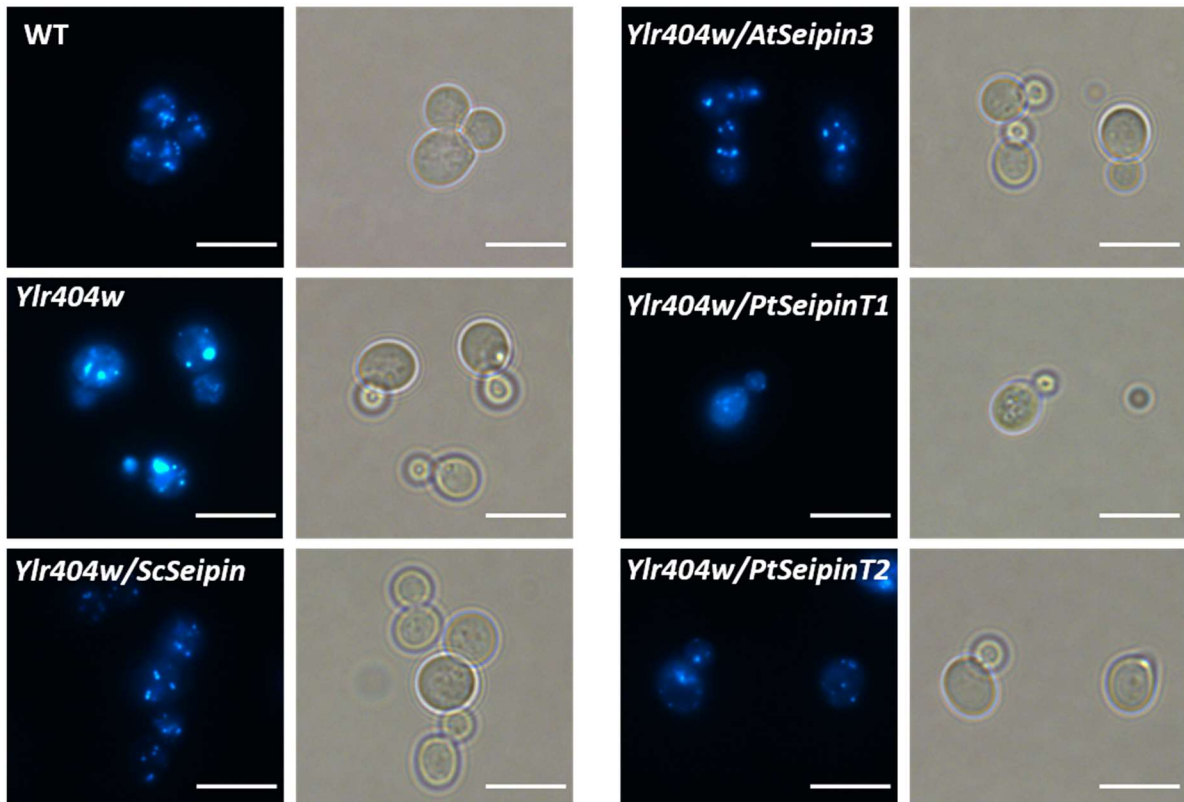
**Figure 41 : Croissance des lignées de levures KO pour la Seipin (*Ylr404w*) complémentées par différents isoformes de Seipin.** La croissance est évaluée par l'absorbance à 600nm en fonction du temps (en heures). Chaque point correspond à la moyenne de 12 réplicats cultivés en parallèles  $\pm$  déviation standard (SD). *WT* : lignée BY4741 transformée par YCplac33, *KO* : lignée *Ylr404w* transformée par YCplac33, *Ylr404w/ScSeipin* : complémenté par la Seipin de *Saccharomyces cerevisiae*, *Ylr404w/AtSeipin3* : complémenté par la Seipin 3 d'*Arabidopsis thaliana*, *Ylr404w/PtSeipin* : complémenté par la Seipin de *Phaeodactylum tricornerutum*.

## 1.3 Caractérisations microscopiques des LD dans les lignées *Ylr404w* complémentées

### 1.3.1 Aspects morphologiques des LD

Les images de microscopie à épifluorescence (**Figure 42**) révèlent les LD marquées par le Monodensylpentane (MDH). En adéquation avec la littérature (Szymanski *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2008), les LD sont en nombre réduit mais de taille plus importante chez le mutant *Ylr404w*. Les

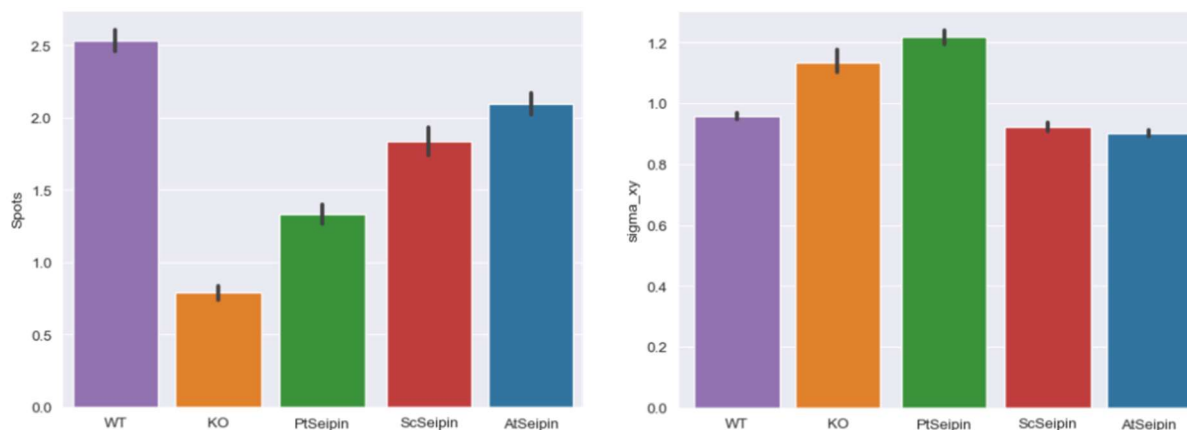
complémentations par *ScSeipin* et par *AtSeipin3* restaurent la morphologie des LD ainsi que leur nombre et partiellement leur taille comme précédemment démontré (Cai *et al.*, 2015). En ce qui concerne la complémentation par *PtSeipin*, le nombre et la taille sont également restaurés lorsque les cellules sont observées à la même DO (*PtSeipinT2*) que les autres lignées. Toutefois, il semble que les limites et contours des LD soient moins bien définies et que l'intensité de fluorescence soit moins intense, notamment lorsque les cellules sont observées à une densité plus faible (*PtSeipinT1*). Une intensité de fluorescence plus diffuse et répartie dans la cellule est observée.



**Figure 42 : Observations microscopiques de lignées de levures KO pour la Seipin (*Ylr404w*) complémentées par différents isoformes de Seipin.** Les cellules ont été observées en microscopie confocale après marquage des gouttelettes lipidiques par le fluorophore Monodensylpentane (MDH). Barre d'échelle : 10 $\mu$ m.

### 1.3.2 Nombre et tailles des LD

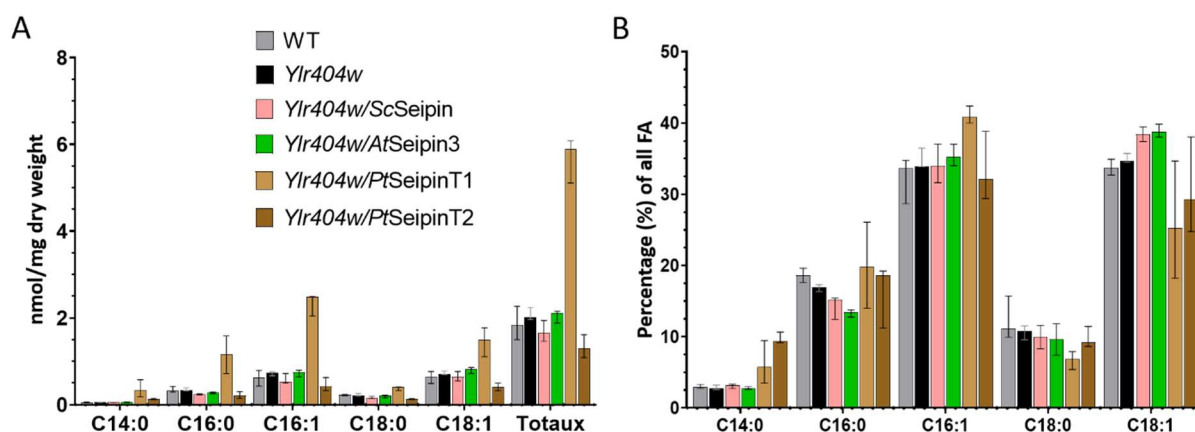
Pour des raisons techniques, la mesure des tailles de LD a été réalisée sur une autre expérience que celle qui est présentée dans cette partie. Ici (**Figure 43**) *PtSeipin* est l'équivalent de *PtSeipinT1* récolté à plus faible DO. À ce temps de culture, on constate que la complémentation par *PtSeipin* permet de restaurer partiellement le nombre de LD par cellule, mais ne permet pas de restaurer leur taille.



**Figure 43 : Nombre et taille des LD dans les lignées de levures KO pour la Seipin (*Ylr404w*) complétées par différents isoformes de Seipin.** Les mesures ont été effectuées comme indiquées dans le (Matériel et Méthodes, partie 5.1.2.2, p225). Spots, nombre moyen de LD dans une cellule ; sigma\_xy, mesure relative de la taille (cf. Matériel et Méthodes, partie 5.1.2.2, p225) ; barres d'erreur = SEM.

#### 1.4 Composition lipidique des lignées

Les analyses fonctionnelles de Seipin dans la levure rapportent des différences dans les compositions lipidiques chez les lignées KO (Fei *et al.*, 2008) qui sont efficacement complétées par ScSeipin et AtSeipin 2 et 3 (Cai *et al.*, 2015). Nous avons cherché à évaluer au niveau lipidique (analyse des profils d'acides gras totaux par GD-FID et analyse des glycérolipides par spectrométrie de masse LC-MS/MS) l'impact sur le lipidome de la complémentation par PtSeipin.



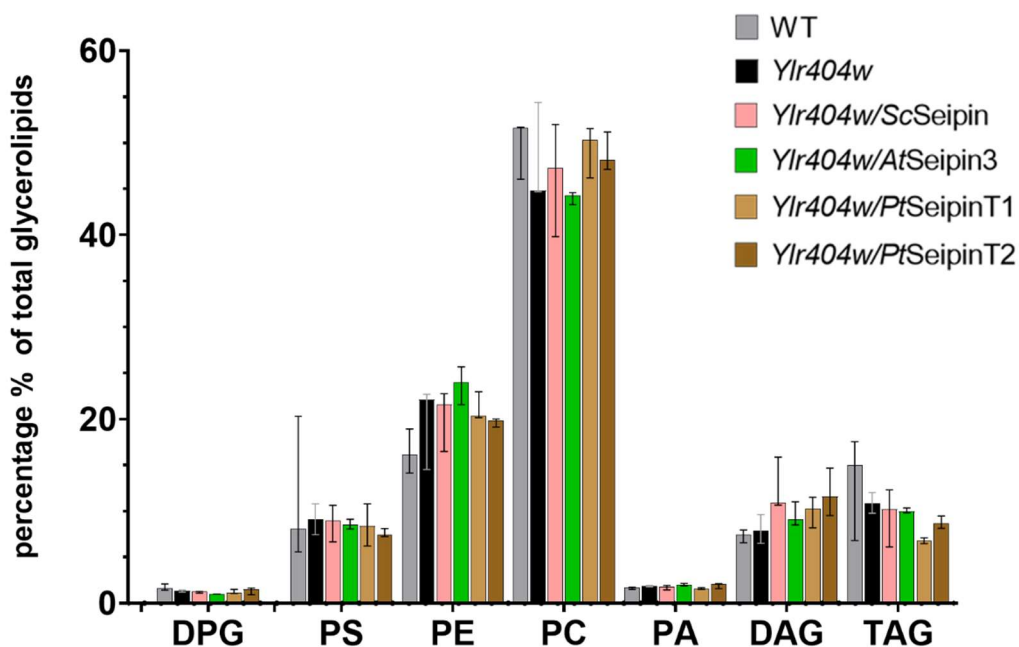
**Figure 44 : Profils d'acides gras totaux des levures KO pour la Seipin (*Ylr404w*) complétées par différents isoformes de Seipin.** (A) : quantités d'acides gras normalisés par la masse sèche. (B) : pourcentage relatif des acides gras (FA) par rapport au pourcentage des acides gras totaux. Les cellules ont été récoltées en fin de phase exponentielle (DO 2,5 environ) sauf *Ylr404w/PtSeipinT1* récolté à DO inférieur à 1. Barplot : médiane, barres d'erreurs : min et max. n=3.

Les profils d'acides gras révèlent des différences dans les lignées complétées (Figure 44). On constate, en effet, assez peu de différences entre la souche sauvage (WT) et la souche *Ylr404w* à part

une légère diminution relative du C16:0. Les lignées complémentées par *ScSeipin* ou bien par *AtSeipin3* montrent une diminution du C16:0 et une augmentation relative du C18:1 (**Figure 44B**).

En revanche, des différences sont constatées pour plusieurs acides gras lorsque les lignées sont complémentées par *PtSeipin*, quel que soit le temps de collecte considéré (T1 ou T2). On observe globalement une quantité d'acides gras plus importante dans *Ylr404w/PtSeipinT1* et plus faible dans *Ylr404w/PtSeipinT2* (**Figure 44A**). On observe une augmentation relative du C14:0 pour ces deux points de cinétique ainsi qu'une diminution du C18:1 malgré des barres d'erreur très importantes. Enfin, une augmentation relative du C16 :1 et une diminution du C18 :0 sont uniquement observées pour *Ylr404w/PtSeipinT1*.

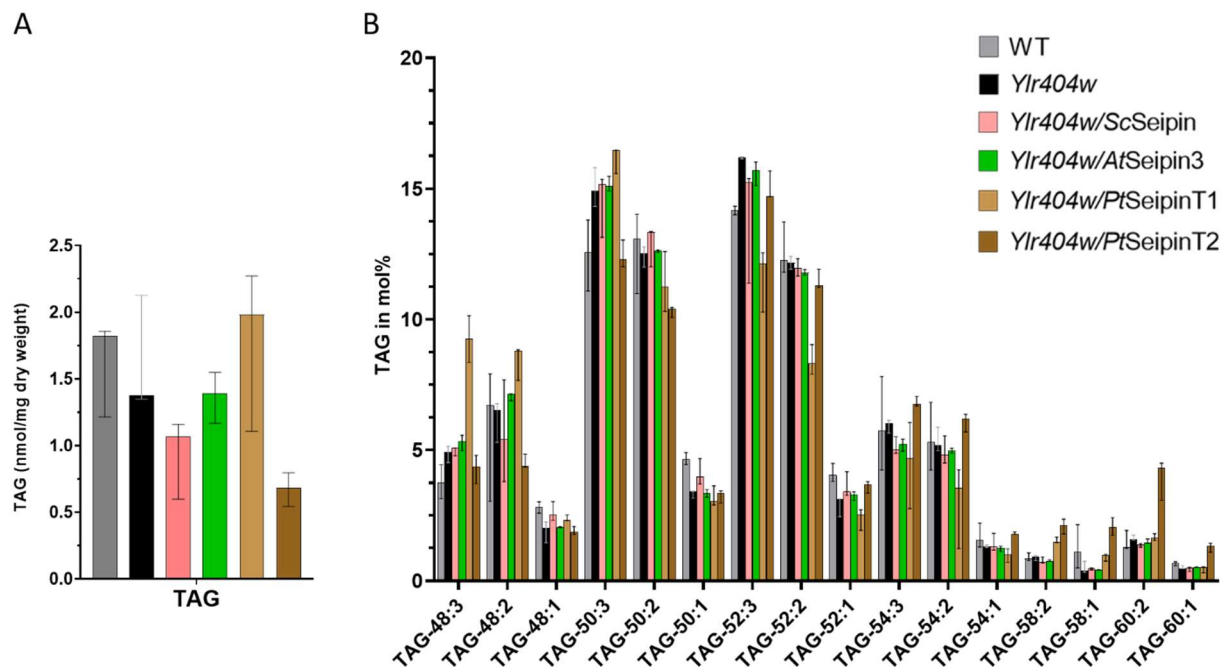
La composition des classes de glycérolipides a été analysée par spectrométrie de masse (**Figure 45**).



**Figure 45 : Profils de glycérolipides dans les lignées de levure KO Seipin et complémentées par différents isoformes de Seipin.** Chaque classe est représentée en pourcentage du total des glycérolipides. DPG : Diphosphatidylglycerol, PS : Phosphatidylserine, PE : Phosphatidylethanolamine, PC : Phosphatidylcholine, PA :Acide Phosphatidique, DAG : Diacylglycerols, TAG : Triacylglycerols. Barplot : médiane, barres d'erreurs : min et max. n=3

Les tendances observées dans les profils de glycérolipides reflètent une augmentation de phosphatidylethanolamine (PE) et de diacylglycerol (DAG) dans les lignées KO, ainsi que dans les lignées complémentées quelle que soit l'isoforme de Seipin exprimée. On constate également une diminution de la phosphatidylcholine (PC) dans le KO et les lignées complémentées par la Seipin de levure ou de plante. Toutes les lignées KO ou complémentées semblent montrer une légère augmentation de la quantité de DAG et diminution de la quantité de TAG par rapport au sauvage.

Les principales différences en quantité touchent ainsi les lipides composant les membranes (PC et PE) ainsi que les TAG composant principalement les gouttelettes lipidiques. Les profils détaillés de ces différents glycérolipides sont présentés ci-dessous (**Figure 46**, **Figure 47**, **Figure 48**).

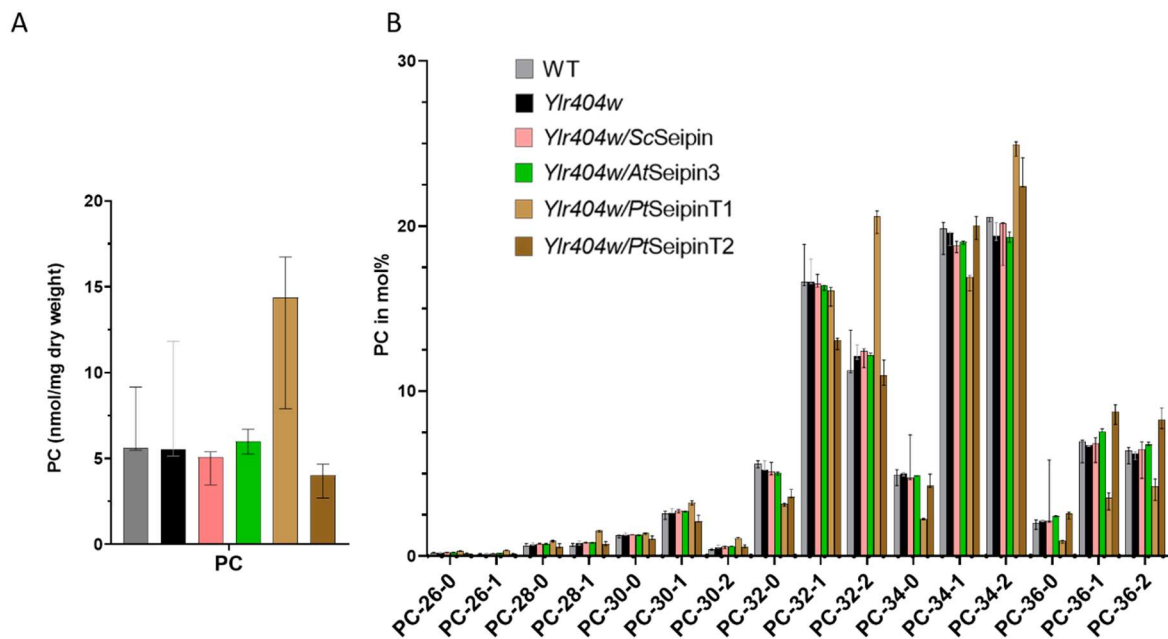


**Figure 46 : Quantité et composition de Triacylglycérols (TAGs) dans les lignées de levure KO Seipin et exprimant différents isoformes de Seipin.** (A) : Les quantités de TAGs sont représentés en nmol par mg de masse sèche. (B) : Les différentes espèces composant les TAGs sont représentées en pourcentage par rapport aux TAGs totaux. Barplot : médiane, barres d’erreurs : min et max. n = 3

La quantité totale de TAGs normalisée par masse sèche dans les lignées testées est moins importante dans les lignées complémentées par ScSeipin, AtSeipin3 et PtSeipinT2. En composition d’acides gras dans les TAGs, les espèces n’ayant qu’un acide gras monoinsaturé (C48:1, C50:1, C52:1, 58:1, 60:1) sont plus faibles dans la lignée KO comme précédemment décrit par (Cai *et al.*, 2015) et revenant à un niveau comparable au sauvage lorsque la Seipin de levure y est complétement. En revanche, la compensation du phénotype par l’expression de ScSeipin ou de AtSeipin3 est moins prononcée que dans leurs travaux.

On note un phénotype contrasté concernant la complémentation par la PtSeipin entre les cellules récoltées à faible DO et celles récoltées en début de phase stationnaire. Les TAG 48:3, 48:2 et 50:3 sont très abondants et 52:3, 52:2 très faible dans le premier lot de cellules récoltés. En revanche, ce sont des espèces comprenant des chaînes d’acides gras plus grandes qui sont majoritaires dans les cellules récoltées en début de phase stationnaire : TAG 54:3, 54:2, 58:2, 58:1, 60:2 et 60:1. Les différences de composition dans les acides gras composant les phosphoglycérolipides sont également très représentatives de ces deux points de cinétique dans les lignées complémentées par

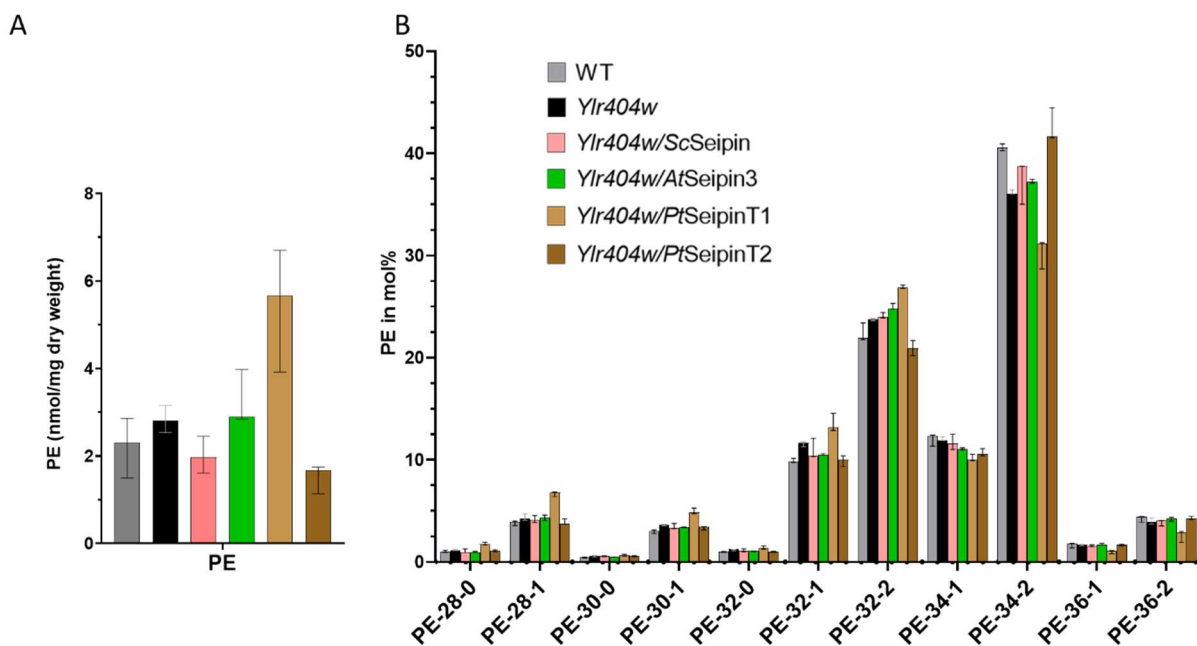
*PtSeipin*. Les quantités totales de phosphoglycérolipides par masse sèche sont plus importantes dans les cellules récoltées à faible DO (voir **Figure 47A**, **Figure 48A**).



**Figure 47 : Quantité et composition de phosphatidylcholine (PC) dans les lignées de levure KO Seipin et exprimant différents isoformes de Seipin. (A) :** Les quantités de PC sont représentées en nmol par mg de masse sèche. **(B) :** Les différentes espèces composant la PC sont représentées en pourcentage totaux de PC. Barplot : médiane, barres d’erreurs : min et max. n =3

On note que des différences dans la composition des PC (**Figure 47B**) ne sont observées que dans les lignées complémentées par *PtSeipin* et non dans les lignées complémentées par les autres isoformes. Certaines espèces de PC sont plus abondantes dans les cellules récoltées à faible DO comme la PC28:1, 30:1, 32:2 et 34:2. Globalement, ce sont davantage d’espèces composant la PC dont l’abondance est diminuée dans ces cellules comme la PC32:0, 34:0, 34:1, 36:0, 36:1, 36:2. À l’inverse, les espèces 36:1 et 36:2 sont plus abondantes uniquement dans *PtSeipinT2*.

Concernant les profils du phospholipide PE (**Figure 48B**), des similarités sont retrouvées avec les profils observés pour la PC. Ainsi, on retrouve les espèces de PE28:1, 30:1, 32:1 et 32:2 plus abondantes dans les cellules récoltées à faible DO et 34:1, 34:2, 36:1, 36:2 sont diminuées. Contrairement à la PC, les espèces 36 :1 et 36 :2 n’augmentent pas dans *PtSeipinT2*, seules PC32:2 et 34:1 diminuent.



**Figure 48 : Quantité et composition de phosphatidylethanolamine (PE) dans les lignées de levure KO Seipin et exprimant différents isoformes de Seipin.** (A) : Les quantités de PE sont représentés en nmol par mg de masse sèche. (B) : Les différentes espèces composant la PE sont représentées en pourcentage totaux de PE. Barplot : median, barres d'erreurs : min et max. n = 3

### 1.5 Conclusion de la complémentation fonctionnelle chez la levure

Dans cette première partie d'étude fonctionnelle de la Seipin de *Phaeodactylum tricornutum*, nous avons cherché à déterminer sa capacité à restaurer le phénotype du KO Fld1 chez la levure. En plus de la taille des LD plus importante et de leur nombre réduit chez la levure, il est également montré que le profil d'acides gras est impacté par la mutation (diminution de 18:1, augmentation de 16:0, 14:0) ainsi que les espèces composant certains phospholipides (Fei *et al.*, 2008). Des travaux précédents conduits de manière similaire chez la levure montrent que la complémentation par les Seipins d'*Arabidopsis* permettent en grande partie de restaurer le phénotype excepté pour l'isoforme AtSeipin1 (Cai *et al.* 2015).

Nos résultats révèlent par des analyses microscopiques que la Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* est capable de restaurer le phénotype, en termes de nombre et de taille des gouttelettes lipidiques en complémentation fonctionnelle chez la levure. Le rôle fonctionnel sur cet aspect de contrôle de la biogenèse des gouttelettes semble donc conservé mais l'analyse plus approfondie révèle des différences suggérant que la Seipin de *Phaeodactylum* perturbe le métabolisme des lipides lorsqu'elle est exprimée chez la levure.

La croissance cellulaire est légèrement affectée dans les lignées complémentées par PtSeipin malgré des conditions de cultures riches et identiques entre toutes les lignées. Les cellules parviennent à



atteindre une densité optique similaire aux autres lignées, mais après une phase de croissance exponentielle plus lente. D'une manière générale, les cellules apparaissent beaucoup plus grosses en tailles lorsqu'elles sont complémentées par *PtSeipin*, et ce au cours de toutes les phases de croissance. Il apparaît compliqué de déterminer quel aspect de la division cellulaire est potentiellement affecté par l'expression de cette isoforme, mais c'est durant la phase de croissance exponentielle que les différences les plus importantes dans la quantité de phospholipides ou dans la composition d'espèces sont relevées. De manière générale, il semble y avoir un retard dans la cinétique des levures complémentées par *PtSeipin*, que ce soit dans la croissance ou dans la composition lipidique. Il pourrait être pertinent de déterminer les compositions de lipides à DO plus faible également dans les autres lignées pour évaluer si les différences observées sont dues à la complémentation ou bien à un effet de phase de croissance.

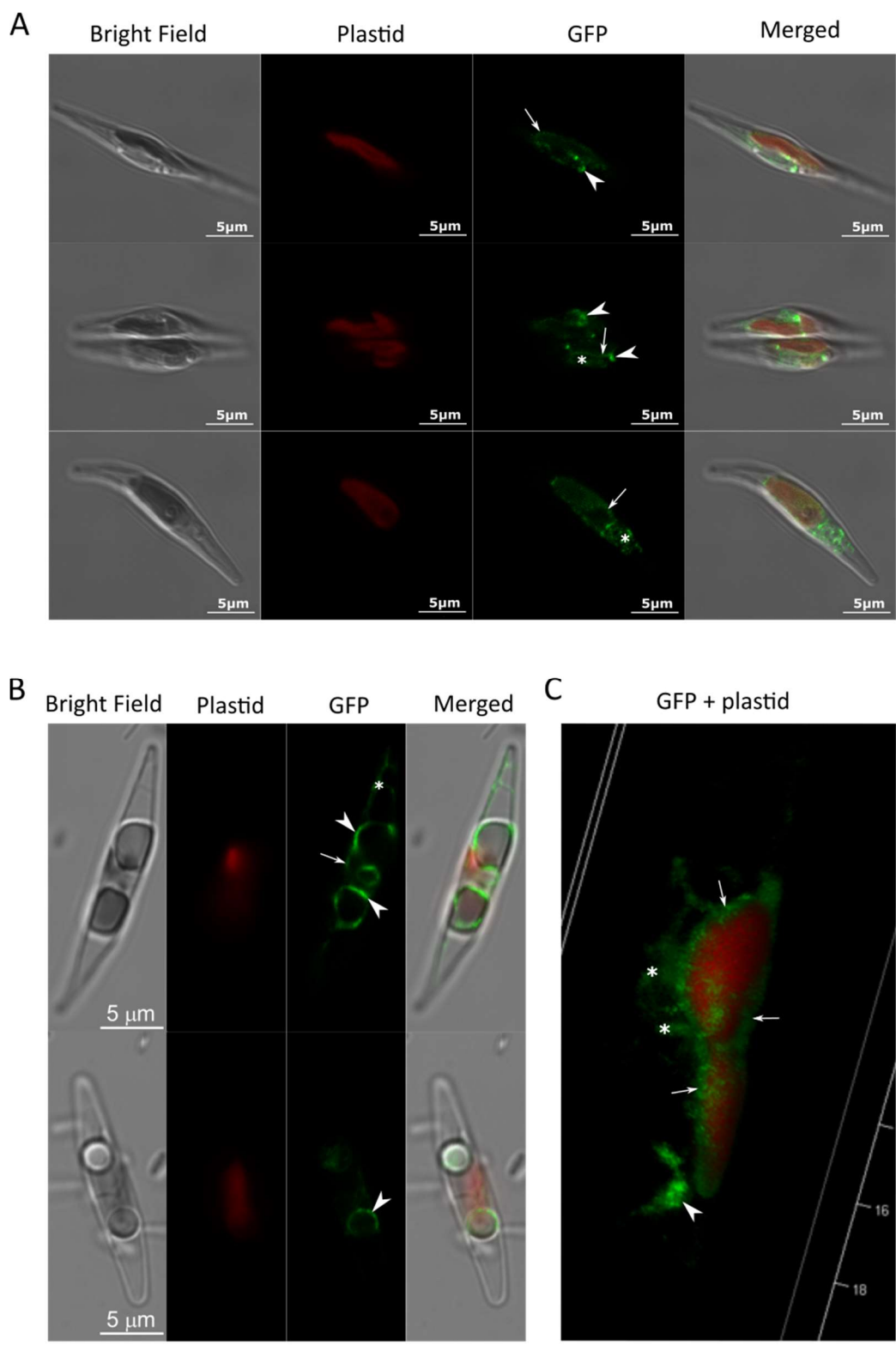
La quantité de phospholipides accumulés dans les cellules à ce moment-là traduit peut-être une biogenèse active de membrane sans parvenir à se diviser. On peut supposer l'impossibilité d'aller compartimentaliser certains FA dans les TAGs qui se retrouvent alors accumulés dans les phospholipides.

## 2 Localisation de *PtSeipin* in vivo chez *Phaeodactylum tricornutum*

### 2.1 Observations microscopiques

Dans tous les organismes étudiés et à notre connaissance, la Seipin est localisée au réticulum endoplasmique (RE), où elle permet entre autre de stabiliser la zone de bourgeonnement des LD à partir de cette membrane (Bohnert, 2020; Walther *et al.*, 2023) (voir Introduction Seipin). De par l'organisation particulière du système endomembranaire chez les diatomées *i.e.* une continuité entre la membrane du réticulum endoplasmique et la membrane externe du plaste, et au vu de précédents résultats suggérant un rôle du plaste dans la biogenèse des gouttelettes lipidiques, nous avons émis l'hypothèse que la Seipin pourrait se localiser au niveau de ces membranes particulières chez *Phaeodactylum tricornutum*.

Pour tester cette hypothèse, nous avons exprimé la séquence codante de *PtSeipin* fusionnée avec celle de la protéine fluorescente verte (GFP) chez *P.tricornutum*. Les lignées obtenues ont été observées en microscopie à épifluorescence ainsi qu'en microscopie confocale (**Figure 49**).



**Figure 49 : Observation en microscopie optique de la localisation *in vivo* de PtSeipin chez *Phaeodactylum tricornerutum*.** Observations par microscopie confocale des lignées Seipin-GFP en phase exponentielle (A) ou bien en carence nutritionnelle (B). (C) Projection d'une reconstruction 3D (cellule en phase de carence nutritionnelle). Pour l'ensemble des images : Bright field = canal microscopique en champ clair, GFP = signal de la protéine fluorescente verte fusionnée à la Seipin, Plastid = autofluorescence du plaste et Merged = superposition des canaux précédemment décrits. Barre d'échelle 5µm. Sur les canaux GFP, le signal à la surface des LD est identifié par la tête d'une flèche, le signal à la surface du plaste par une flèche et le signal dans le système endomembranaire

probablement RE par une astérisque (\*). Les images (B) et (C) ont été obtenues par Hu Hanhua (Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, China) à partir de lignées *PtSeipin*–GFP qu’il a généré dans le cadre d’une collaboration entre nos laboratoires.

Les images de microscopie révèlent que *PtSeipin* se localise effectivement à proximité et autour des LD que ce soit en phase exponentielle (**Figure 49A**) ou bien en phase de carence nutritionnelle (**Figure 49B**). On constate qu’en phase de carence, en présence de LD de taille importante, le signal GFP est toujours localisé autour de celles-ci, de façon discontinue. Cependant, on observe également une localisation plus diffuse et d’intensité plus faible dans le réticulum endoplasmique et en périphérie du plaste (**Figure 49B**).

#### 2.1.1 Conclusion sur la localisation subcellulaire de *PtSeipin*

Ces observations microscopiques permettent de valider la localisation de *PtSeipin* d’une part, aux LD et d’autre part, dans le système endomembranaire et à proximité du plaste.

Néanmoins, il apparaît essentiel de rappeler que ces lignées surexpriment une protéine fusionnée avec la GFP et continuent d’exprimer en parallèle la Seipin endogène. La Seipin est probablement présente dans les cellules à des niveaux d’expression très faible, comme c’est le cas chez *Arabidopsis thaliana* (Kent Chapman/communication personnelle). Par exemple, nous n’avons pas réussi à l’amplifier par RT-qPCR à partir d’ADN complémentaire. Un fort niveau de surexpression couplé à un tag GFP pourrait donc induire des artefacts sur sa localisation.

Récemment, une stratégie de « knock in » a été mise au point chez la diatomée *T.pseudonana* (Onyou Nam *et al.*, 2022). Cette technique repose sur la technologie CRISPR-Cas9 et permet d’introduire une séquence directement dans le génome. Lorsqu’une séquence codant une protéine fluorescente est introduite immédiatement à la suite d’un gène codant, il devient possible de déterminer la localisation de la protéine exprimée sous son promoteur endogène dans des conditions physiologiques proches de conditions « réelles ». De plus, le matériel génétique nécessaire à cette modification génétique est apporté dans la cellule par conjugaison bactérienne sous forme d’épisome, et peut être éliminé simplement après transformation en ne maintenant pas de pression de sélection (Karas *et al.*, 2015). L’optimisation de cet outil chez *P.tricornutum* serait un atout majeur pour la localisation d’un grand nombre de protéines dans des contextes cellulaires dynamiques (rythme circadien ou phases de croissances cellulaires, expression en conditions de stress...).

### 3 Phénotype des mutants *Phaeodactylum tricornutum* invalidés génétiquement ou surexprimant la Seipin en conditions de culture normales

Les parties précédentes mettent en évidence que la fonction de *PtSeipin* dans la biogenèse des LD est conservée puisque l'expression chez des levures KO restaure partiellement le phénotype sauvage en termes de taille et nombre de gouttelettes. Malgré tout, nos résultats montrent qu'elle semble perturber le métabolisme des lipides lorsqu'elle est exprimée dans ce système hétérologue, contrairement à *AtSeipin3*. Bien que ce type d'étude en système hétérologue soit propice à des artefacts, la composition lipidique des levures complémentées par *PtSeipin* montre des spécificités, ce qui rend son étude d'autant plus intéressante chez la diatomée.

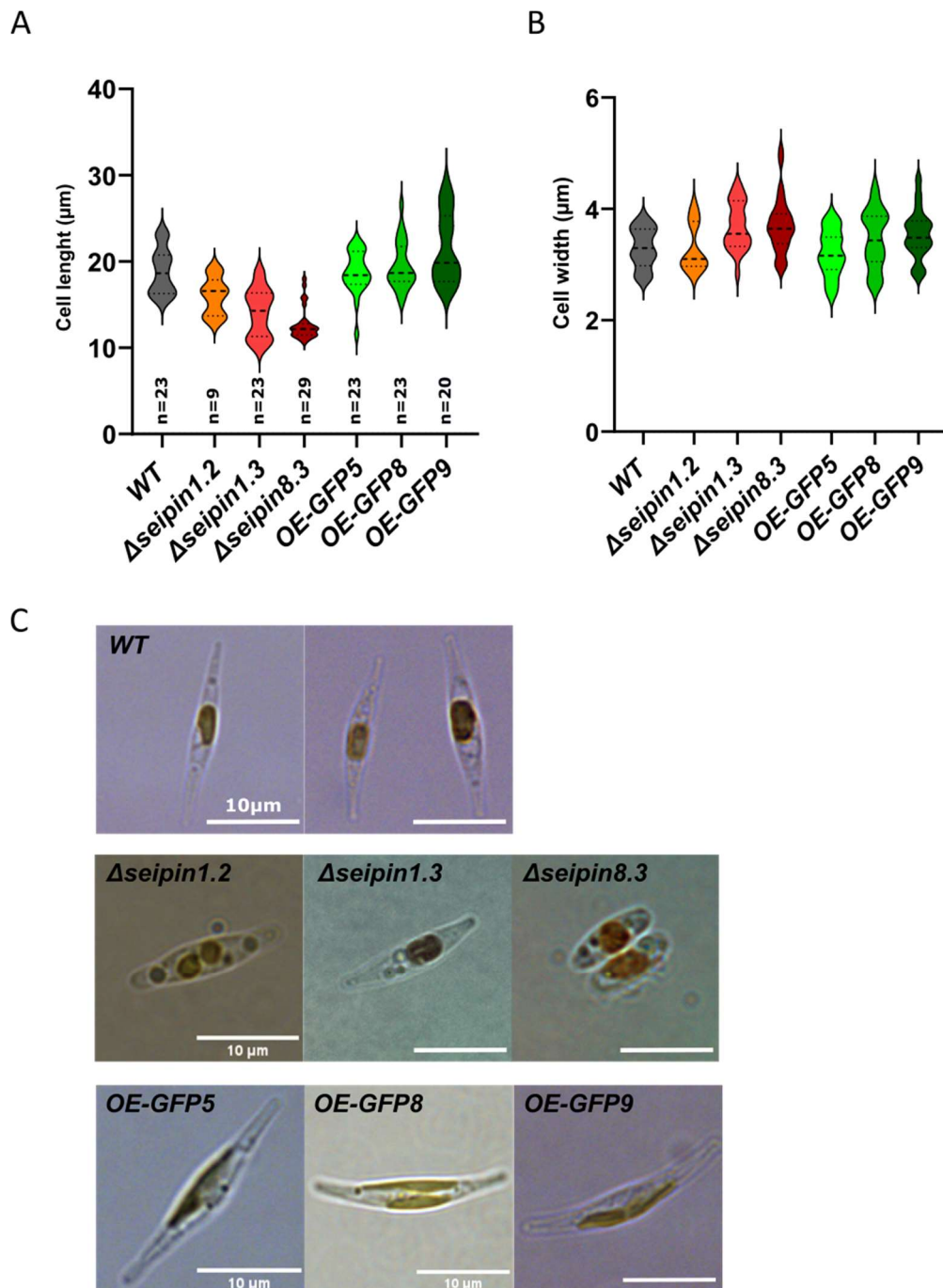
Nous avons ainsi réalisé une analyse fonctionnelle en utilisant les lignées de surexpression *PtSeipin*-GFP décrites ci-dessus d'une part, et en tirant avantage de l'outil moléculaire CRISPR-Cas9 optimisé pour *Phaeodactylum* afin de générer des lignées mutantes Knock-Out (KO) d'autre part. Ces lignées KO avaient été établies et purifiées au laboratoire avant mon arrivée (cf. Matériel et Méthodes, partie 8, p237).

Les expérimentations présentées ici ont été répétées plusieurs fois (5 fois en conditions contrôle incluant, 3 fois en conditions de forte lumière) néanmoins, les résultats d'une seule expérience représentative sont présentés par soucis de clarté. *Nb*, Les résultats d'une seconde expérience n'impliquant que des lignées KO sont donnés en Annexe, p239. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation du phénotype des mutants KO [au moins 3 lignées mutantes générées par deux ARN guide différents nommées *Δseipin (+numéro de la lignée)* cf. Matériel et Méthodes, partie 8, p237] en comparaison avec celui des surexpresseurs nommés *OE-GFP5, 8 ou 9*. Les lignées ont été cultivées dans des conditions de culture que l'on qualifie de « normales », c'est-à-dire pour lesquelles les cellules sont préalablement acclimatées pendant au moins 10 jours. Nous avons porté nos efforts de caractérisation sur les paramètres morphologiques des cellules et des gouttelettes observées en microscopie, sur des paramètres physiologiques de croissance cellulaire ainsi que sur des analyses lipidomiques des glycérolipides totaux extraits à partir des cellules entières.

#### 3.1 Paramètres morphologiques des cellules

Au cours des différentes expérimentations conduites, les cellules ont été observées à plusieurs reprises en microscopie confocale ainsi qu'en microscopie à épifluorescence. Nous avons rapidement constaté que la morphologie des cellules KO pour la Seipin était altérée ; au lieu d'une longue cellule fusiforme caractéristique de la morphologie sauvage de l'écotype Pt1 dans des conditions de culture optimales et non carencées, les KO présentent une morphologie cellulaire plus courte et plus large.

La **Figure 50** regroupe les mesures de longueur et de largeur des cellules cultivées dans des conditions de culture normales et récoltées au cours de deux expérimentations différentes.



**Figure 50 : Morphologie cellulaire des KO et surexpresses de *PtSeipin*. Mesures de la longueur (A) et de la largeur (B) des cellules observées en microscopie confocale en condition de cultures normales. Les mesures ont été effectuées à l'aide du logiciel Fiji en utilisant les images en fond clair et en se plaçant sur le plan focal médian de la cellule. Les effectifs pour chaque lignée sont indiqués sur la figure A. (C) Morphologie des cellules en microscopie. *WT* = groupe sauvage, *Δseipin* = lignée KO (nuances de rouges), *OE-GFP* = lignée surexpresses (nuances de verts).**

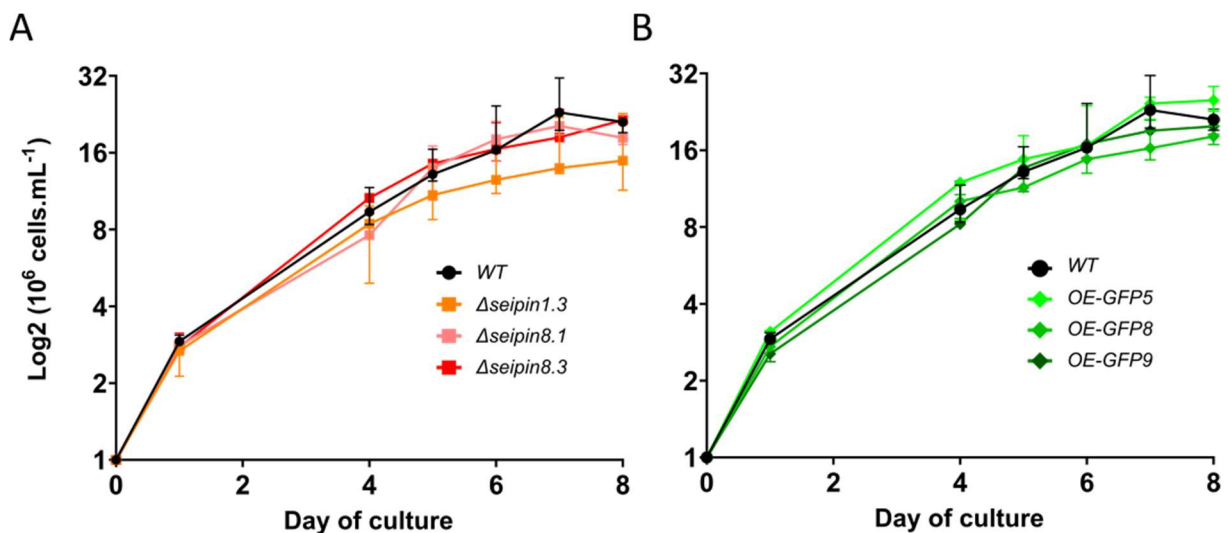
On constate **Figure 50**, que les cellules KO ont tendance à être plus courtes par rapport à la souche sauvage. La largeur de la cellule est également plus importante dans ces deux lignées (**Figure 50B**).

Ces deux paramètres, longueur plus courte et largeur plus importante, donnent aux cellules KO un aspect plus ramassé que les cellules sauvages, ce morphotype est classiquement appelé « ovale » et lié à une forme de stress.

Une seule lignée cellulaire surexprimant la Seipin (OE-GFP9) semble plus longue que la lignée sauvage (**Figure 50A**). Les surexpresseurs apparaissent régulièrement courbés, en forme de faucille (**Figure 50C**) ce qui fausse légèrement notre mesure de longueur de cellule, qui était effectuée en traçant une ligne droite joignant les deux extrémités de la cellule.

### 3.2 Suivi des cultures par mesure de la croissance cellulaire

La mesure de la croissance cellulaire a été basée sur l'absorbance à 730nm. L'équivalence en million de cellules par millilitre (mL) est estimée grâce à une courbe de régression linéaire liant le nombre de cellules et l'absorbance à 730nm (cf. Matériel et méthodes, partie 4.1, p222). Les cellules ont été inoculées à 1 million de cellules par mL au jour 0 (début de la cinétique).



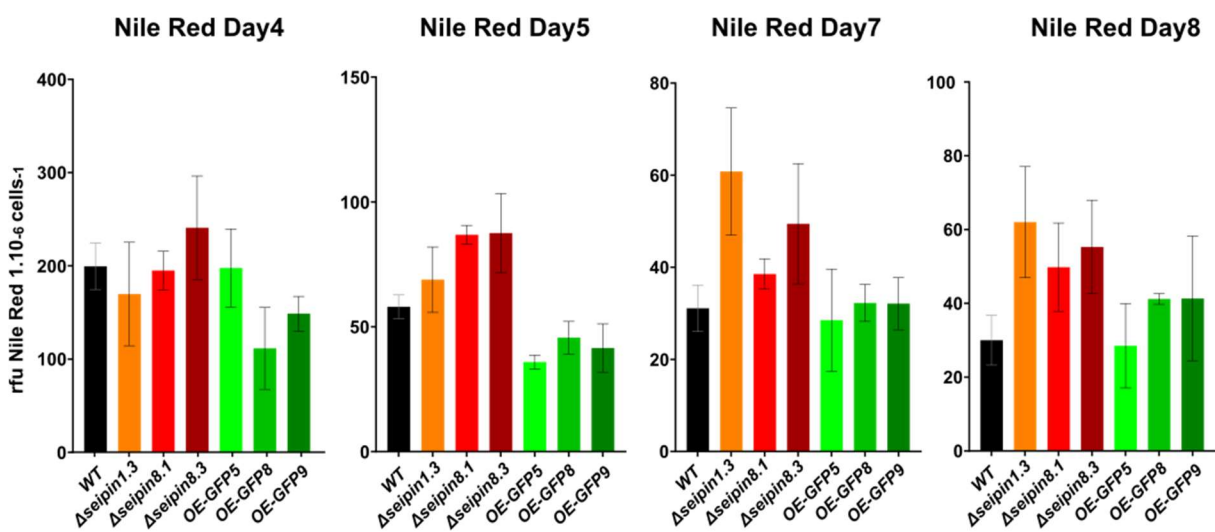
**Figure 51 : Croissance des différentes lignées au cours d'une cinétique de culture de 8 jours.** Les courbes de croissances sont basées sur l'absorbance à 730nm et exprimées en millions de cellules par mL en fonction du temps, en nombre de jours de culture. L'échelle logarithmique base 2 est utilisée pour refléter le doublement lors de la division cellulaire. (A) : courbes de croissance des lignées KO Seipin et (B) des lignées surexpresses. Chaque point correspond à la valeur médiane et les barres d'erreurs aux minimum et maximum. n=3

Lorsque les cellules sont cultivées dans des conditions de culture normales, on observe une phase de croissance exponentielle pendant les 7 premiers jours, suivie d'un début de phase stationnaire entre les jours 7 et 8 pour toutes les lignées. Des différences de croissances sont observées entre les lignées KO Seipin et la lignée sauvage. Les cellules KO semblent se diviser moins rapidement et atteindre une phase stationnaire à densité cellulaire plus faible. Deux des lignées surexpresses atteignent également une densité cellulaire plus faible en fin de cinétique.

### 3.3 Impact de la mutation Seipin sur la morphologie des LD

Nous avons cherché à évaluer l'impact de la mutation de la protéine Seipin sur l'aspect des LD. Pour cela, elles ont été marquées au rouge de Nil, un fluorophore lipophile dont le spectre de fluorescence dépend de la polarité du milieu. Lorsqu'il est utilisé pour marquer les LD, son émission est lue à 580nm après excitation à 530nm. Son intensité de fluorescence est mesurée tous les jours par un spectrophotomètre afin d'évaluer l'accumulation de lipides neutres et des analyses en microscopie confocale ont été réalisées aux jours 4 et 8 afin d'observer l'apparence des gouttelettes.

#### 3.3.1 Marquage au Rouge de Nil



**Figure 52 : Mesure de l'intensité de fluorescence du rouge de Nil dans les cellules à plusieurs jours de la cinétique de culture en condition de culture normale.** Les mesures de l'intensité de fluorescence relative du rouge de Nil sont normalisées par le nombre de cellules en millions pour chaque point de la cinétique.

On constate une augmentation de l'intensité de fluorescence du rouge de Nil par million de cellules chez les trois lignées KO par rapport aux autres lignées au fur et à mesure des jours de culture (à partir du jour 4), suggérant une accumulation d'huile plus importante dans ces lignées.

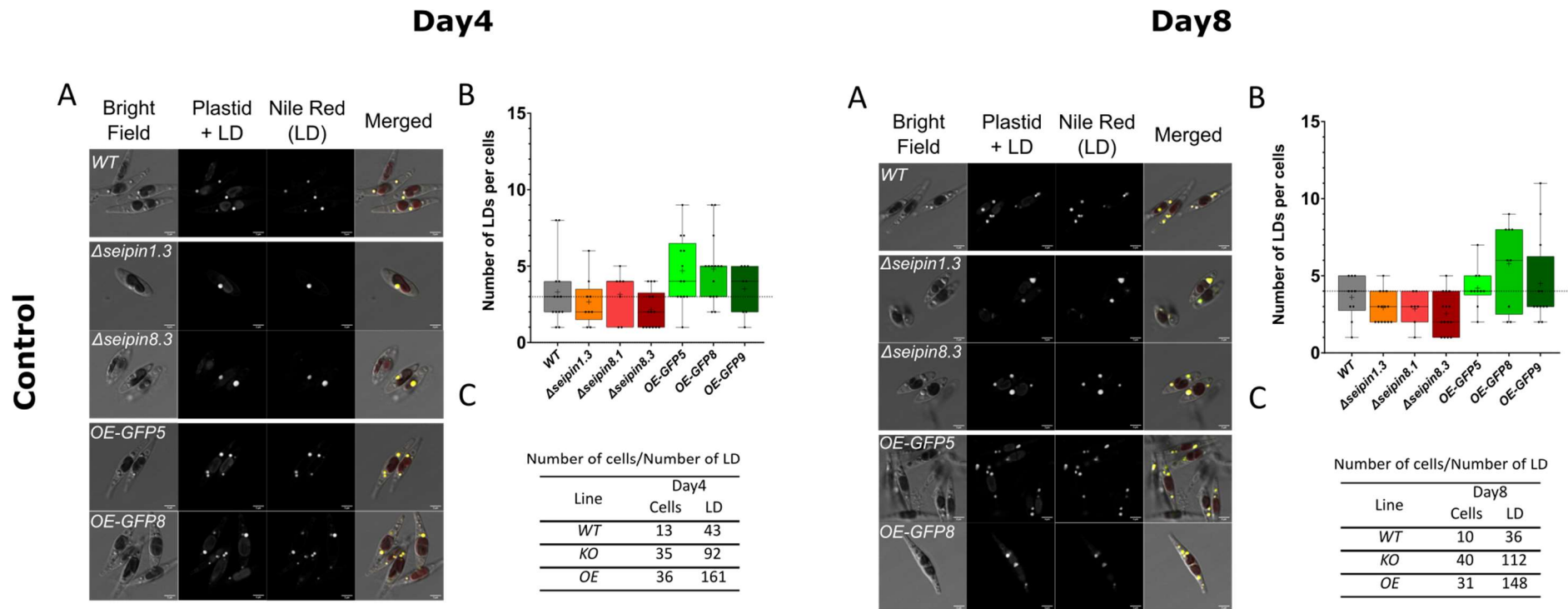
#### 3.3.2 Evaluation des paramètres morphologiques de gouttelettes lipidiques

Le suivi microscopique montre la fluorescence du rouge de Nil fixé aux lipides neutres des LD en jaune sur la **Figure 53**. Les gouttelettes apparaissent sous une forme sphérique comme attendues. Au bout de 4 jours de culture, on peut constater un nombre réduit de gouttelettes dans les cellules KO Seipin par rapport aux autres lignées. Alors qu'on en observe au moins deux par cellules chez la lignée sauvage ou chez les surexprimeurs, une gouttelette par cellule est présente chez les KO sur un même plan focal. Leur taille semble également plus importante, notamment au jour 8 de culture.

Certaines gouttelettes chez les mutants KO n'apparaissent plus totalement sphériques et semblent compressées à l'intérieur de la cellule.

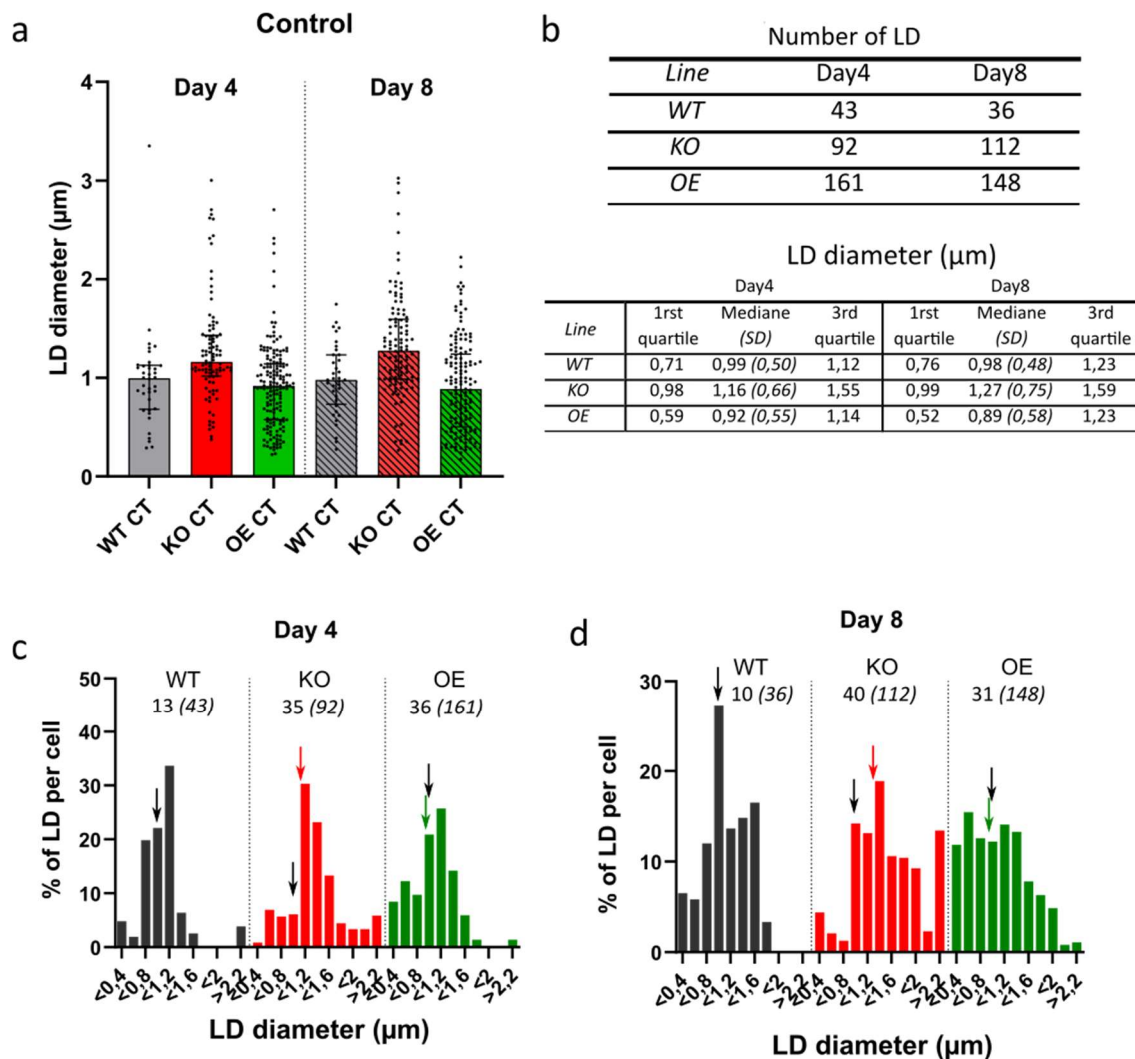
En regroupant les images de microscopie de plusieurs expérimentations indépendantes mais respectant les mêmes conditions de cultures (de manière similaire aux mesures morphologiques des cellules présentées **Figure 50**), des comptages du nombre de LD par cellule et des mesures de leur taille ont été réalisés manuellement à l'aide du logiciel Fiji. Pour chaque image, les mesures de diamètre de la LD ont été effectuées au plan focal correspondant au plan médian.





**Figure 53 : Profils morphologiques des gouttelettes lipidiques en condition de culture normale. Gauche : jour 4 de culture cellulaire ; droite : jour 8 de culture cellulaire.** (A) : images représentatives en microscopie confocale après marquage au rouge de Nil. Les canaux champ clair (bright field), autofluorescence du plaste dans laquelle débordent celle du rouge de Nil (Plastid + LD), fluorescence uniquement du rouge de Nil (Nile Red (LD)) et leur superposition (Merged) sont affichés. (B) diagramme en boîte représentant le nombre de gouttelettes lipidiques par cellule dans les lignées sauvages, KO et surexprimeurs. Chaque point reflète une cellule. La médiane chez le sauvage est prolongée par une ligne pointillée sur la largeur du graphique. (C) : Tableau indiquant le nombre de cellules et le nombre de LD considéré dans les lignées. Les données de trois lignées KO et des trois lignées OE ont été combinées.

La **Figure 53** montre une tendance générale à la réduction du nombre de gouttelettes lipidiques par cellule chez les mutants KO par rapport au sauvage et à une augmentation chez les surexprimeurs quel que soit le jour de prélèvement [**Figure 53**, observations microscopiques (a) et diagramme en boîte (b)]. Sur les images de microscopie en confocale, les dimensions des LD semblent plus importantes chez les mutants KO comparées aux lignées sauvages et OE. Ces paramètres de taille ont été évalués et sont présentés **Figure 54**.



**Figure 54 : Estimation de la taille des LD dans les mutants Seipin et répartition selon leur diamètre en condition de culture normale.** (a) : Diamètre des LD. Chaque point correspond à une LD mesurée dans une cellule. Barplot = médiane, barres d'erreurs = 1ers et 3eme quartiles. (b) Tableau supérieur représentant le nombre de LD totales prises en considération pour les analyses et tableau inférieur représentant la médiane des diamètres des LD (déviations standard entre parenthèses en italique). (c) et (d) : Distribution des LD en fonction de leur diamètre. Les pourcentages correspondent à la probabilité de trouver une LD de la dimension indiquée dans une cellule. Les chiffres sous le nom de la lignée indiquent le nombre de cellules et le nombre de LD (entre parenthèse) considérés. La flèche noire indique la taille médiane du diamètre des LD chez le WT, reportée sur les KO et OE. Les flèches de couleur indiquent la médiane du diamètre des LD chez les mutants. (c) jour 4 et (d) jour 8. Pour toutes les figures, les données de trois lignées KO et des trois lignées surexprimeurs OE ont été combinées.

L'analyse des populations de LD révèle une taille plus importante dans les lignées KO : on relève une médiane concernant le diamètre de la LD chez les KO de 1,16 $\mu$ m (Jour4) et 1,27 $\mu$ m (Jour8) alors qu'elles sont inférieures à 1 $\mu$ m dans la lignée sauvage et dans les lignées OE. Ce décalage de distribution est également observé à travers les 1ers et 3emes quartiles, systématiquement plus importants dans les KO (**Figure 54b**). En outre, la valeur de la déviation standard est également plus forte chez les KO et reflète une dispersion plus importante et une hétérogénéité plus forte dans la distribution des LD.

Nous avons ainsi classé dans des intervalles de 0,2 $\mu$ m entre 0,4 et 2,2 $\mu$ m les diamètres des LD (**Figure 54c,d**). Le pourcentage de LD par cellules au sein de chaque intervalle y est représenté. On peut constater un décalage dans la distribution chez le KO. On constate également chez le KO que des LD de toutes dimensions sont détectées ce qui renforce la dispersion plus importante observée (**Figure 54a,b**). On peut d'ailleurs relever qu'au bout de 8 jours de culture, la population de LD d'un volume >2,2 $\mu$ m devient importante chez le KO tandis qu'elle est absente chez le sauvage. On constate également de manière équivalente des LD de très petites tailles (inférieures à 0,8 $\mu$ m) que de LD de tailles moyennes (entre 0,8 et 1,4 $\mu$ m) chez les surexprimeurs au jour 8. Dans la lignée sauvage, ces populations de LD de très petites tailles sont minoritaires et encore davantage chez le KO.

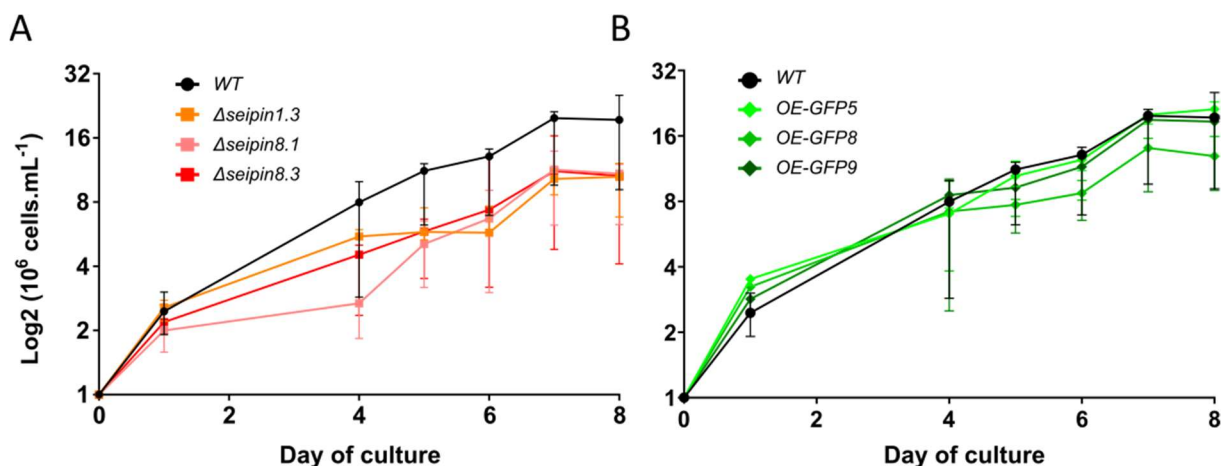
Ces paramètres morphologiques confortent ainsi les observations microscopiques d'une taille plus importante de LD chez les lignées KO tout en soulignant les nombreuses gouttelettes de petites tailles chez les surexprimeurs.

4 Phénotype des mutants *Phaeodactylum tricornutum* invalidés génétiquement et soumis à un stress lumineux

#### 4.1 Suivi de la croissance des cultures

De la même manière qu'en condition de cultures normales, la croissance des cellules sous forte lumière a été suivie pendant 8 jours.

On constate (**Figure 55**) que la croissance des cellules KO semble davantage affectée par rapport à la lignée sauvage et aux lignées surexprimeurs. Des différences de croissances sont notées dès les premiers jours de culture et on atteint une densité cellulaire presque deux fois moins importante pour les lignées mutantes KO. Les lignées surexprimant la Seipin ne sont quant à elles pas affectées comparé à la lignée sauvage. Si l'on compare à la condition de culture normale, des concentrations cellulaires moins importantes sont atteintes au bout de 8 jours, la phase stationnaire ne semble pas encore clairement atteinte.

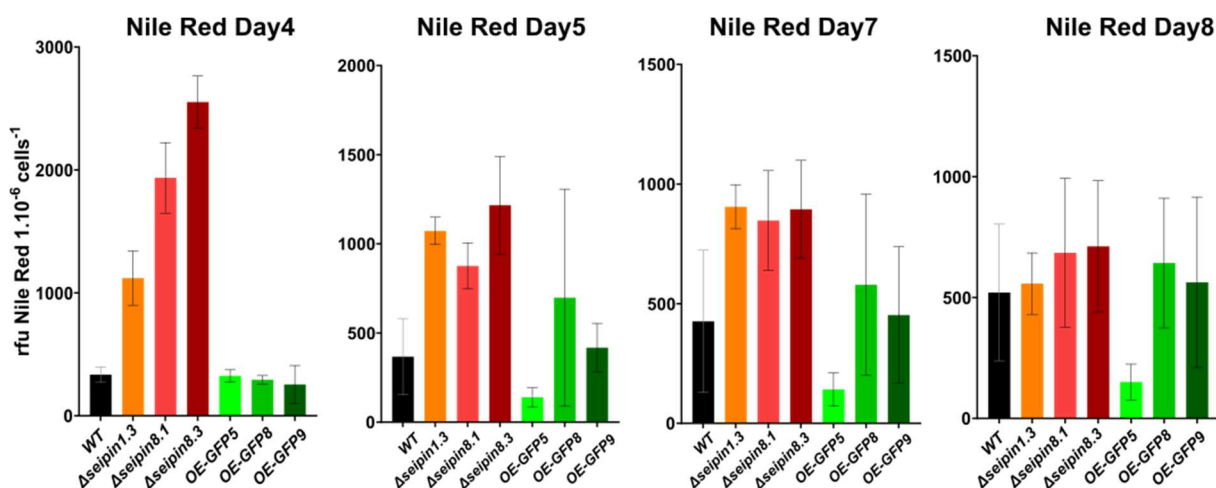


**Figure 55 : Croissance des différentes lignées au cours d'une cinétique de culture de 8 jours sous forte lumière.** Les courbes de croissance sont basées sur l'absorbance à 730nm et exprimées en millions de cellules par mL en fonction du temps, en nombre de jours de culture. L'échelle logarithmique base 2 est utilisée pour refléter le doublement lors de la division cellulaire. (A) : courbes de croissance des lignées KO Seipin et (B) des lignées surexprimeurs. Chaque point correspond à la valeur médiane et les barres d'erreurs aux minimum et maximum. n=3

#### 4.2 Sensibilité des mutants Seipin à un stress lumineux

De la même manière qu'en condition de cultures normales, les cellules cultivées sous forte lumière ont été observées en microscopie confocale aux jours 4 et 8 après marquage au rouge de Nil. La fluorescence du rouge de Nil a été suivie tous les jours de la culture.

##### 4.2.1 Marquage au Rouge de Nil



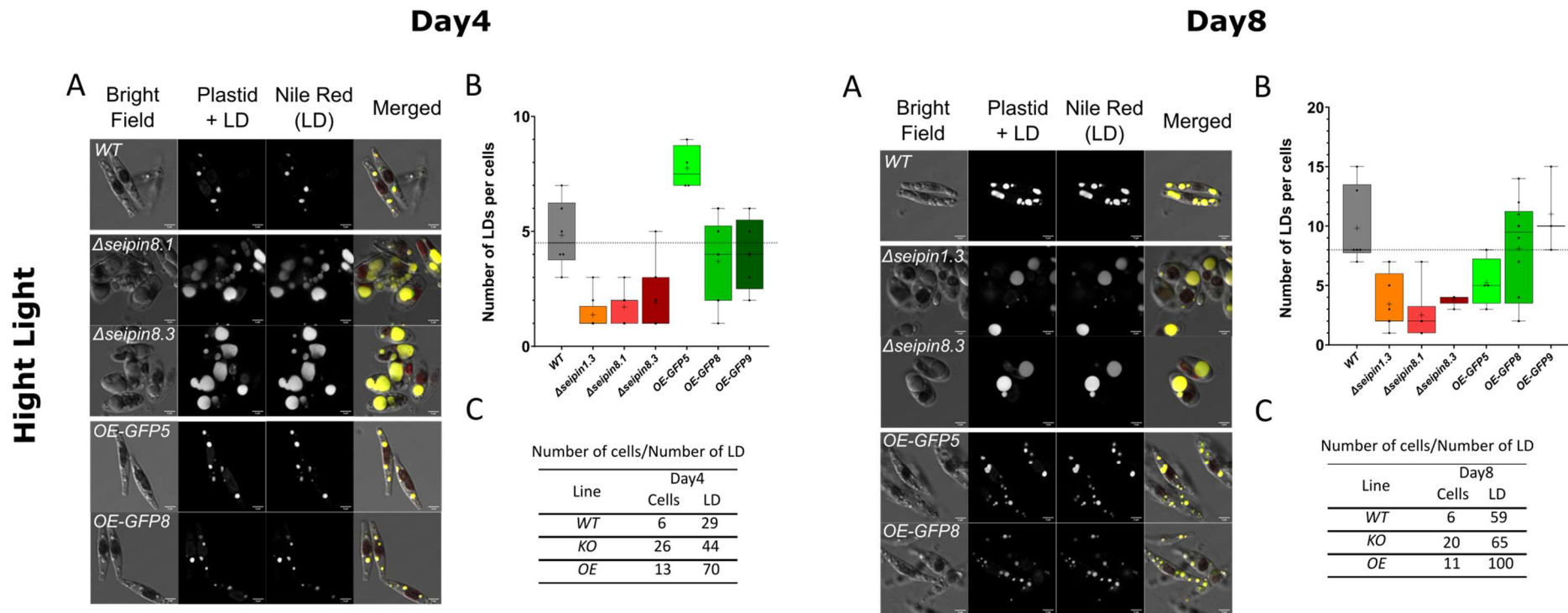
**Figure 56 : Mesure de l'intensité de fluorescence du rouge de Nil dans les cellules à plusieurs jours de la cinétique de culture en condition de forte lumière.** Les mesures de l'intensité de fluorescence relative du rouge de Nil sont normalisées par le nombre de cellules en millions pour chaque jour de la cinétique.

Les mesures du rouge de Nil montrent une intensité de fluorescence plus importante chez les mutants dans les jours les plus précoces de la cinétique. Elle est très importante au jour 4 par rapport

à la souche sauvage et aux OE. L'intensité de fluorescence dans les autres lignées augmente plus tardivement dans la cinétique de culture et devient équivalente au jour 8.

#### 4.2.2 Paramètres morphologiques des gouttelettes lipidiques

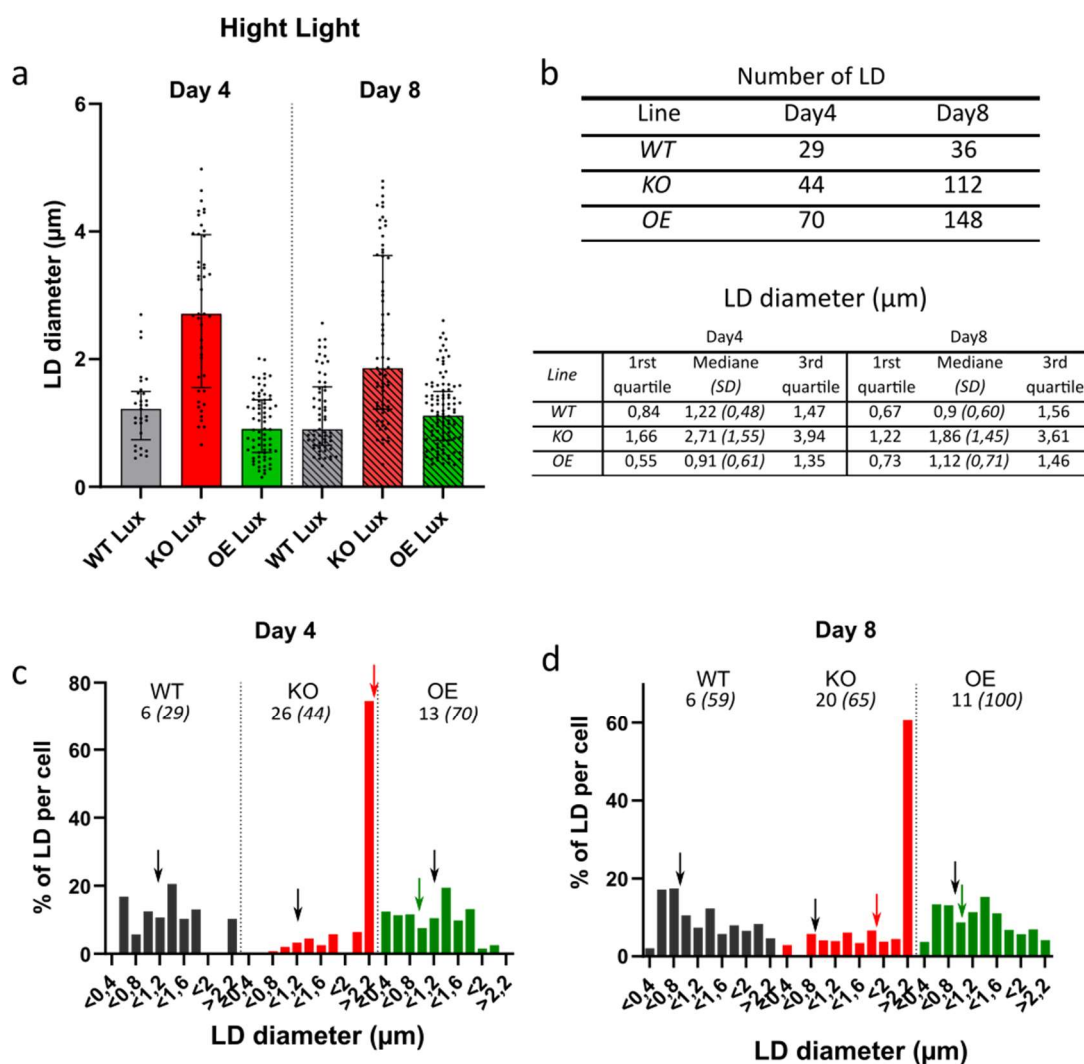
Lorsque les cellules sont soumises à un stress lumineux, les caractéristiques que l'on observait chez les mutants KO en condition normales sont fortement amplifiées. Les LD y apparaissent désormais d'une taille extrêmement importante et occupent la majeure partie du volume cellulaire pour un grand nombre de cellules, ce dès le jour 4 de la cinétique de stress lumineux. Pour les lignées sauvage et surexprimeurs, une exposition prolongée jusqu'au jour 8 montre une accumulation de LD plus nombreuses mais réduites en taille comparée, au mutant qui arbore toujours une LD de taille très importante par cellule.



**Figure 57 : Profils morphologiques des gouttelettes lipidiques en condition de forte lumière. Gauche : jour 4 de culture cellulaire ; droite : jour 8 de culture cellulaire.** (A) : images représentatives en microscopie confocale après marquage au rouge de Nil. Les canaux champ clair (bright field), autofluorescence du plaste dans laquelle débordent celle du rouge de Nil (Plastid + LD), fluorescence uniquement du rouge de Nil (Nile Red (LD)) et leur superposition (Merged) sont affichés. (B) diagramme en boîte représentant le nombre de gouttelettes lipidiques par cellule dans les lignées sauvages, KO et surexprimeurs. Chaque point reflète une cellule. La médiane chez le sauvage est prolongée par une ligne pointillée sur la largeur du graphique. (C) : Tableau indiquant le nombre de cellules et le nombre de LD considéré dans les lignées. Les données des trois lignées KO et des trois lignées OE ont été combinées.

En condition de forte lumière, le nombre de gouttelettes par cellules est significativement différent pour toutes les lignées KO par rapport à la lignée sauvage. Pour la majorité des cellules KO, une seule gouttelette est observée tandis qu'on en retrouve au minimum 3 chez le sauvage. Une lignée de surexpresseurs présente également un nombre plus important de gouttelettes au jour 4 par rapport à la lignée sauvage. On constate qu'au jour 8 le nombre moyen de gouttelettes augmente pour toutes les lignées par rapport au jour 4, une différence significative étant maintenue entre les KO et le sauvage.

Les paramètres morphologiques relatifs au diamètre des LD ont été également mesurés dans la condition de forte lumière (**Figure 58**).



**Figure 58 : Estimation de la taille des LD dans les mutants Seipin et répartition selon leur diamètre en condition de culture normale.** (a) : Diamètre des LD. Chaque point correspond à une LD mesurée dans une cellule. Barplot = médiane, barres d'erreurs = 1ers et 3eme quartiles. (b) Tableau supérieur représentant le nombre de LD totales prises en considération pour les analyses et tableau inférieur représentant la médiane des diamètres des LD (déviation standard entre parenthèses en italique). (c) et (d) : Distribution des LD en fonction de leur diamètre. Les pourcentages correspondent à la probabilité de trouver une LD de la dimension indiquée dans une cellule. Les

chiffres sous le nom de la lignée indiquent le nombre de cellules et le nombre de LD (entre parenthèses) considérés. La flèche noire indique la taille médiane des LD chez le WT, reportée sur les KO et OE. Les flèches de couleur indiquent la médiane du diamètre des LD chez les mutants. (c) jour 4 et (d) jour 8. Pour toutes les figures, les données de trois lignées KO et des trois lignées surexpressesurs OE ont été combinées.

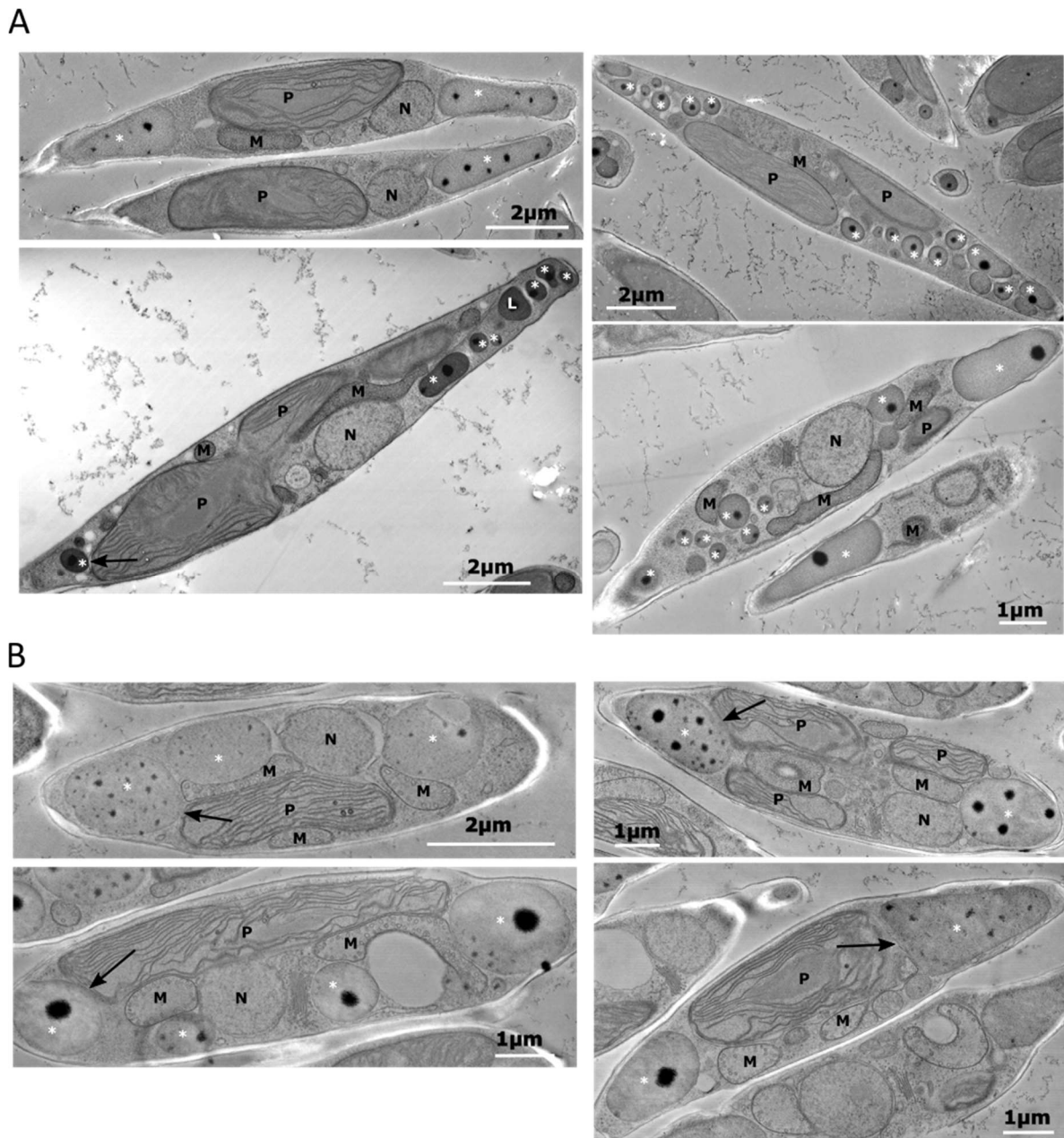
On constate dans cette condition de stress que les diamètres de LD chez les mutants KO sont supérieurs aux autres lignées aux jours 4 et 8 de la cinétique (**Figure 58a**) reflétés par des valeurs de médiane et de quartiles bien plus importants. La forte valeur de déviation standard concernant les KO rend compte d'une dispersion importante des LD autour de la médiane.

Lorsque l'on classe les populations de gouttelettes, les KO se détachent de manière frappante de par une population quasiment unique et majoritaire de gouttelettes lipidiques d'une taille supérieure à  $2,2\mu\text{m}$  alors que très peu atteignent cette taille dans les autres lignées (**Figure 58**). La répartition est beaucoup plus homogène et répartie entre  $0,6$  et  $1,8\mu\text{m}$  pour les lignées WT et surexpressesurs aux deux points de la cinétique (jours 4 et 8).

#### 4.2.3 Observations en microscopie électronique

Des cellules sauvages et mutantes KO cultivées sous forte lumière pendant 7 jours ont été observées en microscopie électronique afin d'évaluer les conséquences sur l'organisation intracellulaire que peut avoir la présence d'une seule gouttelette de taille très importante chez le KO par rapport à plusieurs gouttelettes de taille inférieure chez le WT.





**Figure 59 : Observations en microscopie électronique de cellules sauvages et de cellules mutantes cultivées pendant 7 jours sous forte lumière. (A) cellules sauvages et (B) cellules mutantes KO Seipin, lignée  $\Delta$ Seipin1.3. Légende, N : Noyau, P : Plaste, M : Mitochondrie. Les LD sont marquées par des astérisques (\*). Les flèches noires portent attention à des zones de proximité entre plaste et gouttelettes lipidiques. Les cellules ont été Cryo fixées.**

Des différences importantes sont observées en microscopie électronique entre les cellules de diatomées sauvages (**Figure 59A**) et les cellules mutantes KO pour la Seipin (**Figure 59B**). Chez les mutants, on observe toujours une gouttelette de taille très imposante comparée à plusieurs petites LD chez la souche sauvage. Les LD apparaissent comprimées contre les autres organites ou contre la paroi cellulaire interne. Parmi les organites ainsi en contact avec les LD, le plaste est très souvent concerné (flèches noires, **Figure 59**). De manière intéressante chez le KO, la surface de contact entre gouttelette et plaste est souvent large et les structures membranaires y apparaissent très diffuses.

Dans toutes les LD, on observe également des zones très denses aux électrons formant un ou plusieurs amas dont les limites sont diffuses. Alors qu'on observe généralement une de ces zones denses par LD chez le sauvage, un grand nombre sont identifiées par LD chez les mutants. La technique de fixation par le froid (Cryofixation) utilisée ici permet de révéler ces zones au cœur des LD et de conserver de manière bien plus fine les structures membranaires des organites, tandis que des techniques de fixation chimique que nous avons réalisées en amont ne permettaient pas de les mettre en évidence. Des observations similaires ont été constatées dans les LD de *Sanguina nivaloides* (Ezzedine *et al.*, 2023). Il a été proposé que ces nanostructures pouvaient correspondre à des phase liquides riches en pigments telles que des caroténoïdes dans le cœur de la LD, en plus des TAGs. Dans la biogénèse des LD, le chargement des TAGs, puis de ces molécules y sont décrits par étape. Alors qu'aucun pigment ne soit observé pendant le stade précoce de formation des LD (de petites tailles émergeant du RE), elles semblent ne se charger en caroténoïdes que lors des stades ultérieurs.

Des pigments notamment  $\gamma$  et  $\beta$ -Carotène ont été détectés dans la LD de *P. tricornutum* en condition de carence en azote (Lupette *et al.*, 2019). Il est très probable que les LD produites en condition de forte lumière soient plus riches en pigments permettant de protéger la cellule. De tels dosages pourraient être envisagés dans le futur.

Ces observations suggèrent que la composition des LD en molécules hydrophobes comme des pigments, doit être sub-compartmentalisée et que cette architecture est affectée chez les mutants KO Seipin ; d'une certaine manière, les caroténoïdes doivent se trouver déstabilisés dans le procédé de leur délivrance au sein des LD. On peut également supposer dans le cas où plusieurs petites LD fusionneraient ensemble, que des vestiges de ces sous-compartiments soient dispersés dans la LD de taille plus importante qui en résulterait.

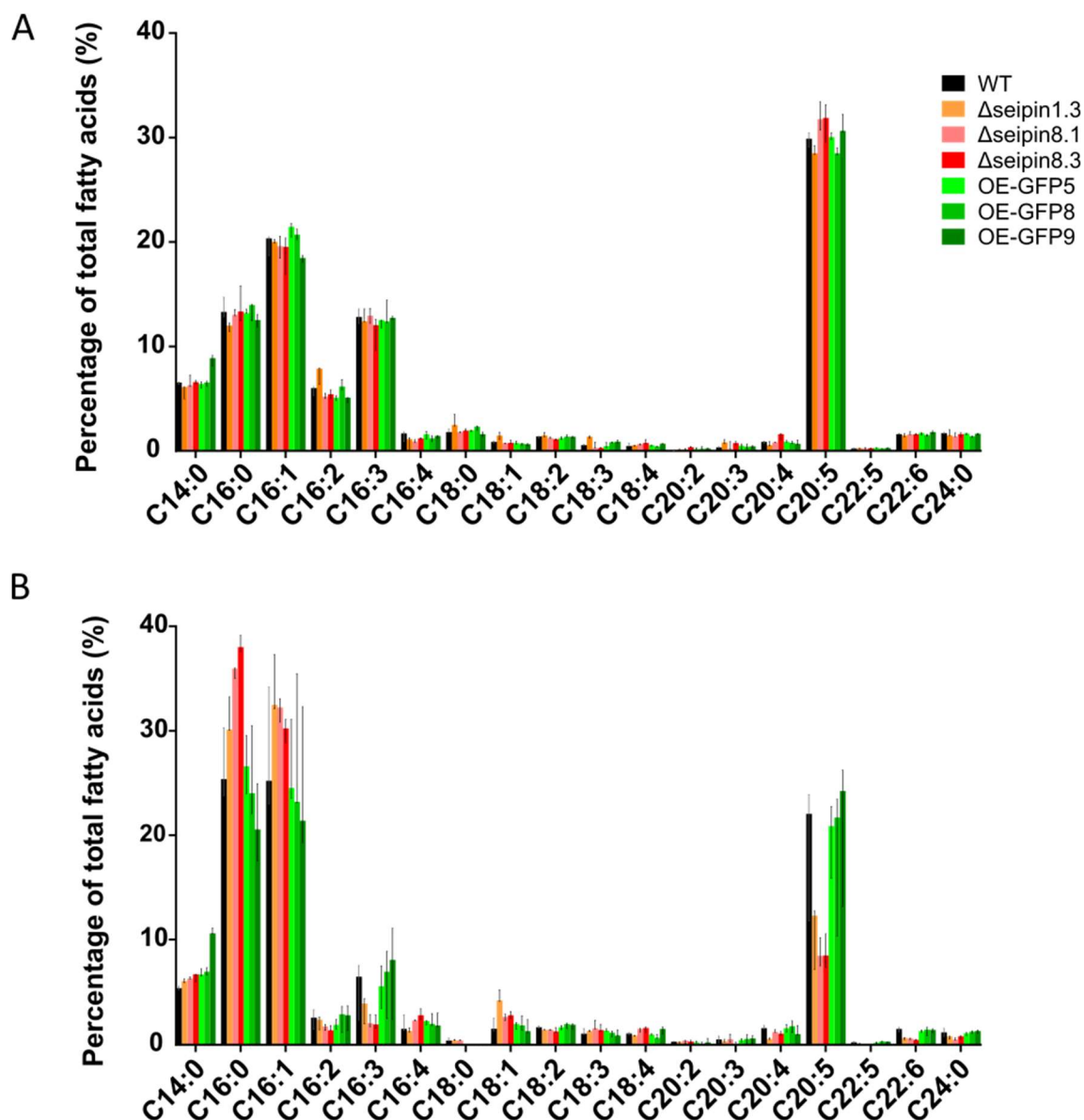
## 5 Impact de la mutation Seipin sur le glycérolipidome de *Phaeodactylum tricornutum* en conditions normales ou de stress lumineux

Les analyses microscopiques et les marquages au rouge de Nil des lignées contrôles et des lignées surexpresses révèlent ainsi des différences importantes dans le nombre, la taille, la morphologie des gouttelettes lipidiques chez les lignées mutantes. Une augmentation de la fluorescence du rouge de Nil suggère une augmentation de l'accumulation de lipides neutres au sein de ces gouttelettes ; les différences sont nettement plus importantes en condition de stress lumineux et apparaissent bien plus rapidement, dès le 4ème jour de cinétique de culture cellulaire. Ces résultats traduisent une hypersensibilité des lignées mutantes dans l'accumulation de LD, accentuée par l'imposition d'un stress comme le stress lumineux.

Nous avons cherché à caractériser les profils lipidomiques totaux des différentes lignées par des analyses en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) et de spectrométrie de masse en tandem (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 6.5, p229). Les profils de répartition des différentes classes de lipides (phospholipides incluant la PC et la PE, galactolipides incluant le MGDG et le DGDG, ou lipides neutres incluant les DAG et les TAG) ont ainsi été établis. Au sein de chacune de ces classes de lipides, les profils des espèces moléculaires ont également pu être établis et reflètent la répartition des longueurs et du nombre d'insaturations des chaînes d'acides gras qui les composent.

#### 5.1 *Profils des chaînes d'acides gras chez les mutants KO Seipin*

Les quantités relatives d'acides gras ont été évaluées dans les différentes lignées par chromatographie en phase gazeuse et révèlent des différences principalement en condition de forte lumière chez les mutants KO.



**Figure 60 : Profils d'acides gras des lignées sauvages, KO Seipin et surexpresseurs à 4 jours de culture cellulaire.** Les acides gras ont été séparés du squelette glycérol par réaction de méthanolyse, séparés par chromatographie en phase gazeuse et détectés par ionisation de flamme. (A) : profils en condition de cultures normales. (B) : profils en condition de cultures sous forte lumière.

On observe **Figure 60** qu'en condition de culture normale, l'acide eicosapentaénoïque (C20:5) à très longue chaîne carbonée est l'acide gras majoritaire et représente environ 30% des acides gras totaux. Les acides gras à 16 carbones mono ou poly insaturés (C16:0, C16:1, C16:3) représentent chacun entre 10 et 20% des acides gras totaux. Les acides gras à 18 carbones (C18) et à 22 carbones (C22) avec différents degrés d'insaturations représentent chacun une fraction mineure des acides gras totaux. Dans la condition de culture normale, aucune différence significative n'est relevée entre les différentes lignées étudiées (**Figure 60A**).

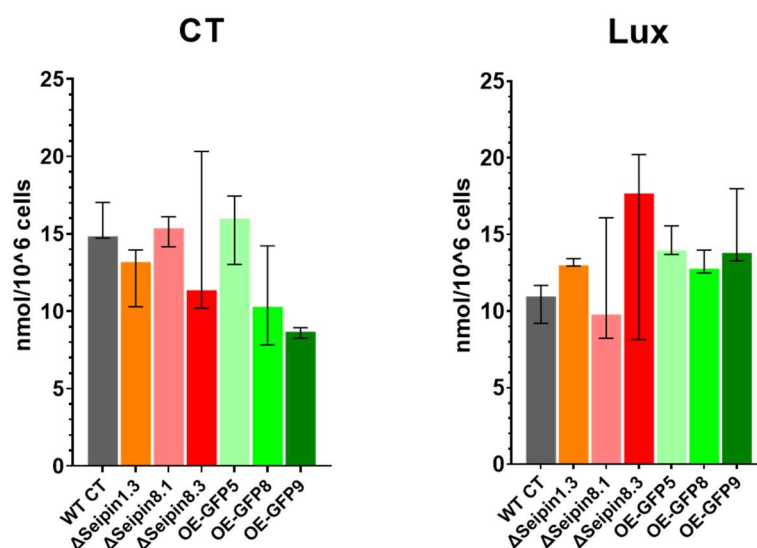
En revanche, en condition de forte lumière on constate que chez la souche sauvage et les surexprimeurs, les acides gras C16:0 et C16:1 augmentent et représentent chacun 25% des acides gras totaux, de façon quantitativement équivalente avec le C20:5, qui baisse par rapport à la condition contrôle. Les lignées mutantes KO montrent une proportion des acides gras C16:0 et C16:1 encore plus importante atteignant 30 à 35% des acides gras totaux, en contrepartie des C20:5 qui chutent à environ 10%. On note également quelques différences supplémentaires chez les KO comme une tendance à une diminution pour les C16:2, C16:3, C22:5 et une augmentation des C18:1.

Les profils d'acides gras au jour 8 sont très similaires à ceux du jour 4 que ce soit en condition de culture normale ou de forte lumière.

## 5.2 Profils des classes de glycérolipides

Les quantités totales de lipides et les profils des classes de glycérolipides sont présentés dans cette partie pour les lignées sauvage, KO et surexprimeurs récoltés après 4 ou 8 jours de culture et cultivés en condition de cultures normales ou bien de forte lumière.

### 5.2.1 Quantités de lipides en phase exponentielle



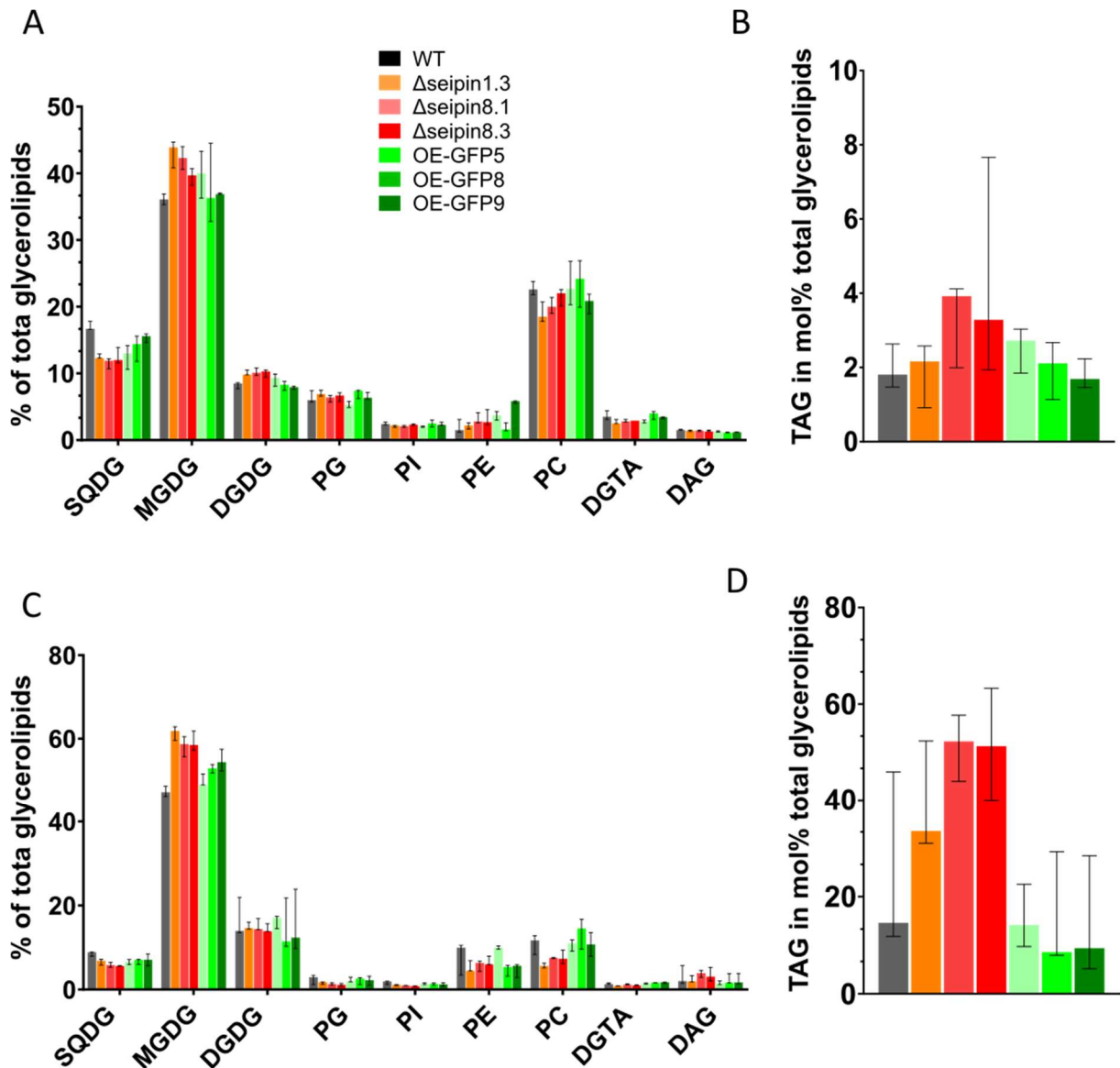
**Figure 61 : Quantités totales de glycérolipides par millions de cellules récoltées après 4 jours de culture.** Conditions normales (gauche) ou bien sous stress lumineux (droite).

Les quantités totales de lipides sont assez hétérogènes en début de cinétique de croissance surtout en condition de culture normale. On observe une tendance dans la quantité de lipide à la hausse dans les lignées mutantes et surexprimeurs comparés à la souche sauvage en condition de forte lumière.

## 5.2.2 Composition lipidique en phase exponentielle

Pour rappel, les classes de glycérolipides évoquées ici se répartissent comme suit dans les membranes :

- Membranes plastidiales et probablement périplastidiales internes : SQDG, MGDG, DGDG, PG
- Membranes extraplastidiales et lipides de réserves : DGTA ; PC, PE, DAG et TAG.



**Figure 62 : Profils des glycérolipides après 4 jours de culture cellulaire en condition normale et en condition de forte lumière.** (A) et (B) : profils relatifs des glycérolipides en excluant les TAG en mol% (A) et proportion des TAGs par rapport aux glycérolipides totaux en condition de culture normale (B). (C) et (D) : condition de forte lumière. Trois répliques biologiques par lignées sont représentés par la valeur médiane, les barres d'erreurs représentent les valeurs minimale et maximale.

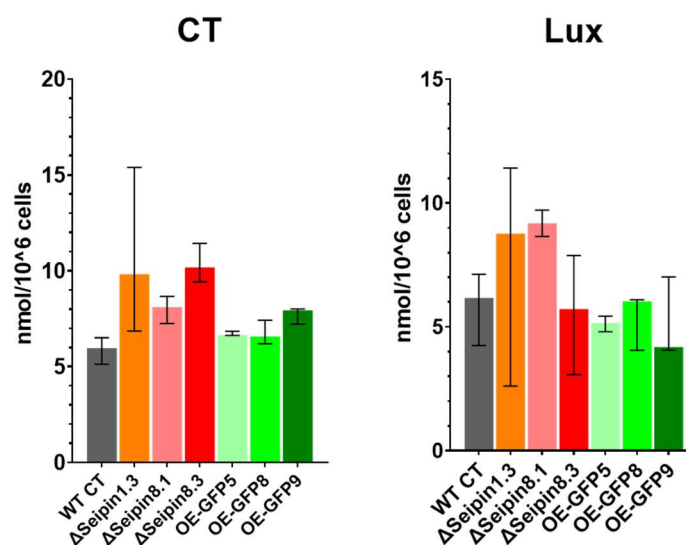
Les profils sont présentés ici en séparant les TAG des glycérolipides, car ils représentent une proportion beaucoup trop importante dans certaines conditions, introduisant un biais dans les comparaisons relatives des autres classes.

On peut constater une tendance à une accumulation de TAG supérieure chez les mutants KO en condition de culture normale (**Figure 62B**), qui est également observée dans les différentes cinétiques que nous avons réalisées. En condition de forte lumière, la quantité de TAG augmente dans toutes les lignées par rapport à la condition normale et représente jusqu'à 60% des lipides totaux chez les mutants (**Figure 62D**). Dans les lignées sauvages et surexpresseurs, la quantité de TAG représente environ 15 à 30% des lipides totaux. Un réplicat de la souche sauvage montre cependant une quantité de TAG très forte (45%).

Lorsque l'on compare les profils totaux entre les deux conditions, on constate que le stress lumineux modifie les proportions relatives de lipides. On constate une augmentation des galactolipides dans toutes les lignées, opposée à une diminution globale des autres lipides (**Figure 62A et C**).

Dans les deux conditions, chez les mutants KO, on observe également une tendance à l'accumulation des galactolipides et au contraire une diminution de SQDG, PE et PC.

### 5.2.3 Quantités totales de lipides en début de phase stationnaire



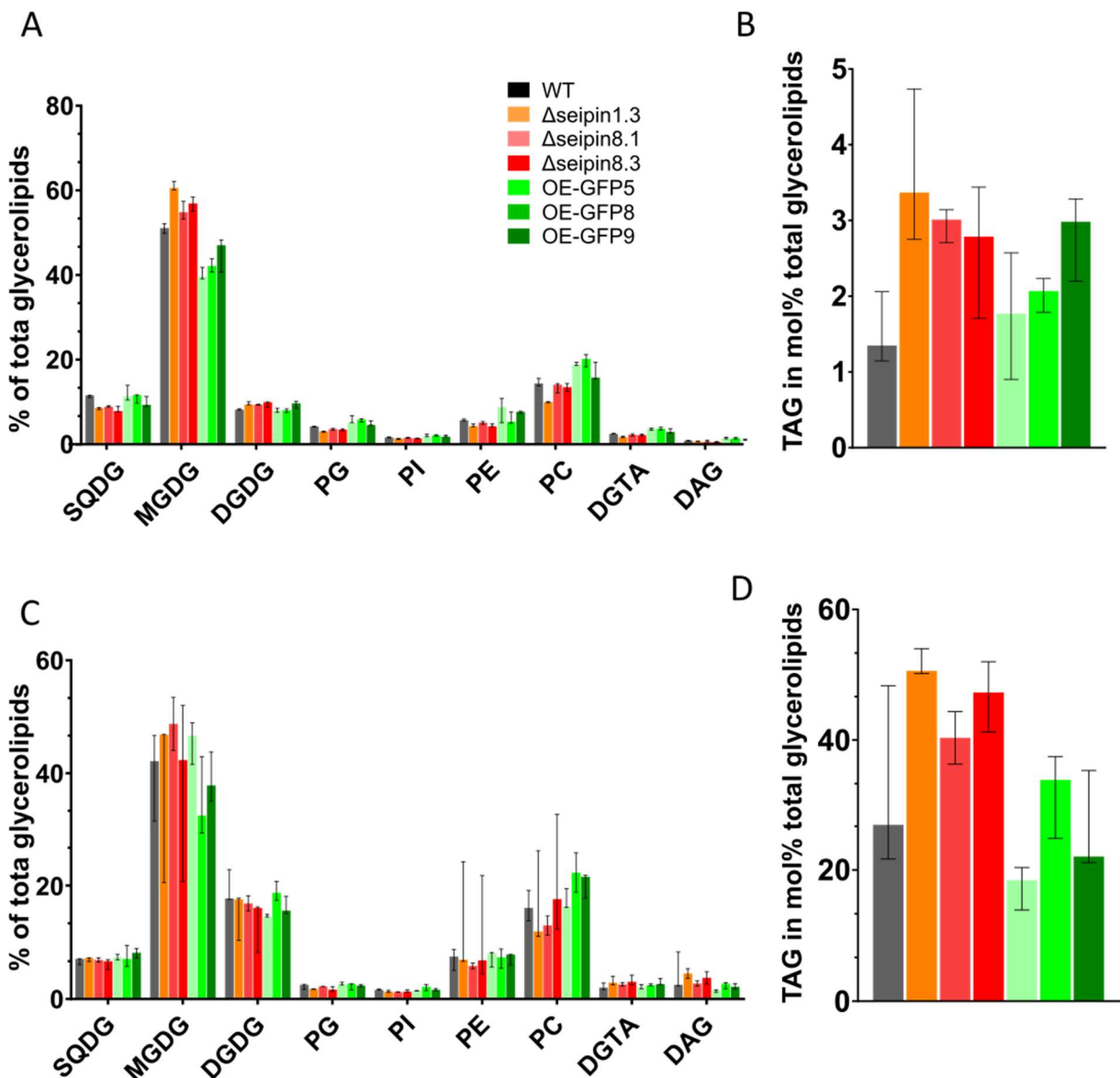
**Figure 63 : Quantités totales de glycérolipides par millions de cellules récoltées après 8 jours de culture.** Conditions normales (gauche) ou bien sous stress lumineux (droite).

Lorsque la culture se prolonge, on observe globalement plus de lipides chez les lignées KO en condition de culture normale comparé à la souche sauvage et aux surexpresseurs. En revanche, en condition de forte lumière ces quantités sont bien plus variables entre les différents réplicats.

### 5.2.4 Compositions lipidiques en début de phase stationnaire

Au jour 8 de culture cellulaire, des tendances similaires que celles décrites précédemment sont observées (**Figure 64**) avec néanmoins une variabilité inter réplicats assez importante dans les

proportions de certains glycérolipides en condition de forte lumière chez les mutants.



**Figure 64 : Profils des glycérolipides après 8 jours de culture cellulaire en condition normale et en condition de forte lumière.** (A) et (B) : profils relatifs des glycérolipides en excluant les TAG en mol% (A) et proportion des TAGs par rapport aux glycérolipides totaux en condition de culture normale (B). (C) et (D) : condition de forte lumière. Trois réplicats biologiques par lignées sont représentés par la valeur médiane, les barres d'erreurs représentent les valeurs minimale et maximale.

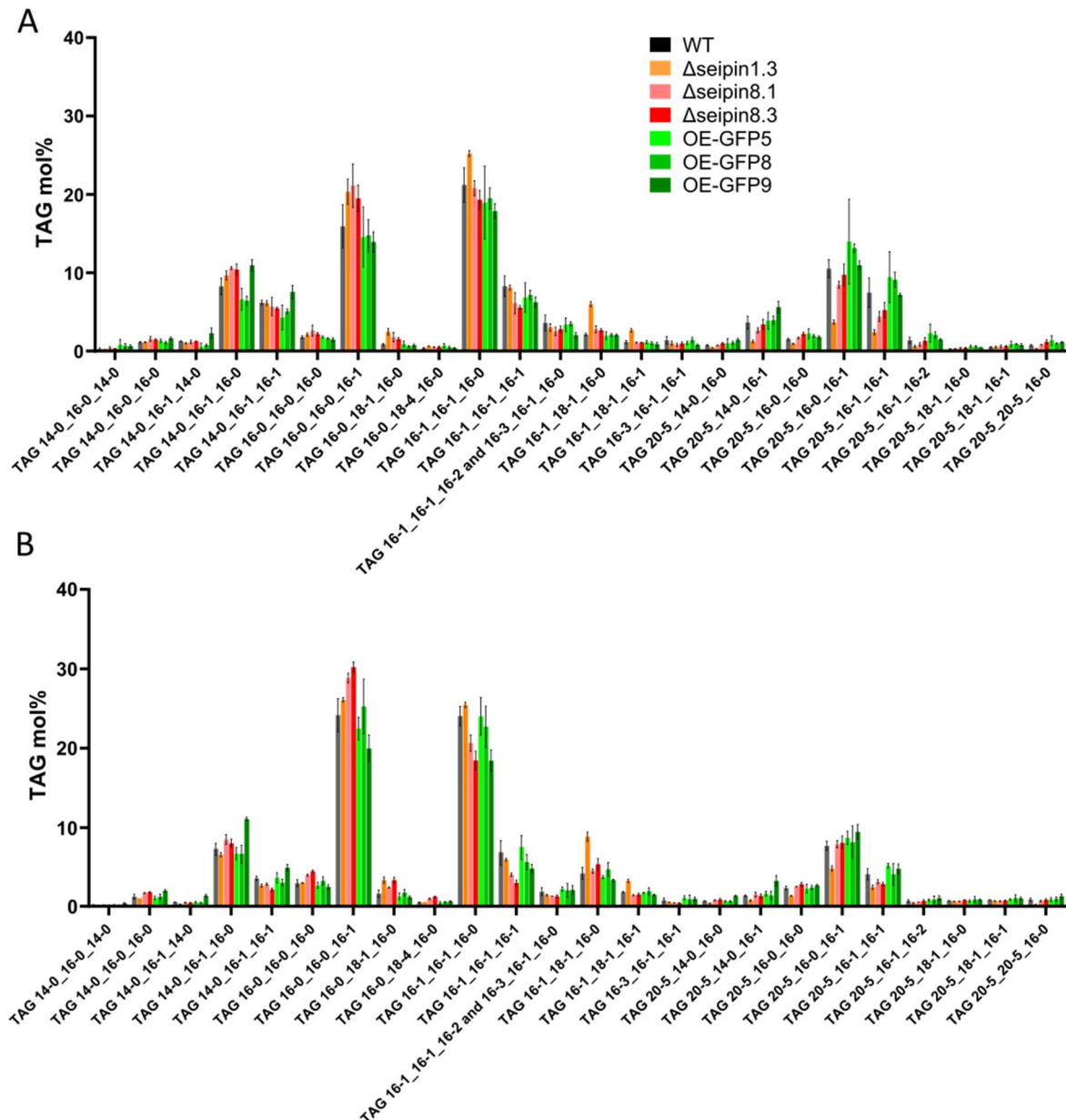
### 5.3 Profils des espèces de lipides

Dans cette partie sont présentés les profils des espèces constituant les différentes classes de glycérolipides au 8ème jour de la cinétique, car les différences que l'on observe respectent celles qu'on observe au jour 4 mais y sont accentuées. Au regard de l'accumulation de TAG chez les lignées mutantes par rapport aux lignées sauvages ou aux lignées surexpresses, le profil des TAG est détaillé en premier lieu.



Puis, afin de comprendre d'où viennent les différences dans les compositions des chaînes d'acides gras dans les TAGs, l'attention est portée sur les profils des glycérolipides membranaires. Des signatures particulières sont observées dans les lipides phosphatés PE et PC ainsi que dans le betaine lipide DGTA et sont également décrites.

### 5.3.1 Profils des TAG



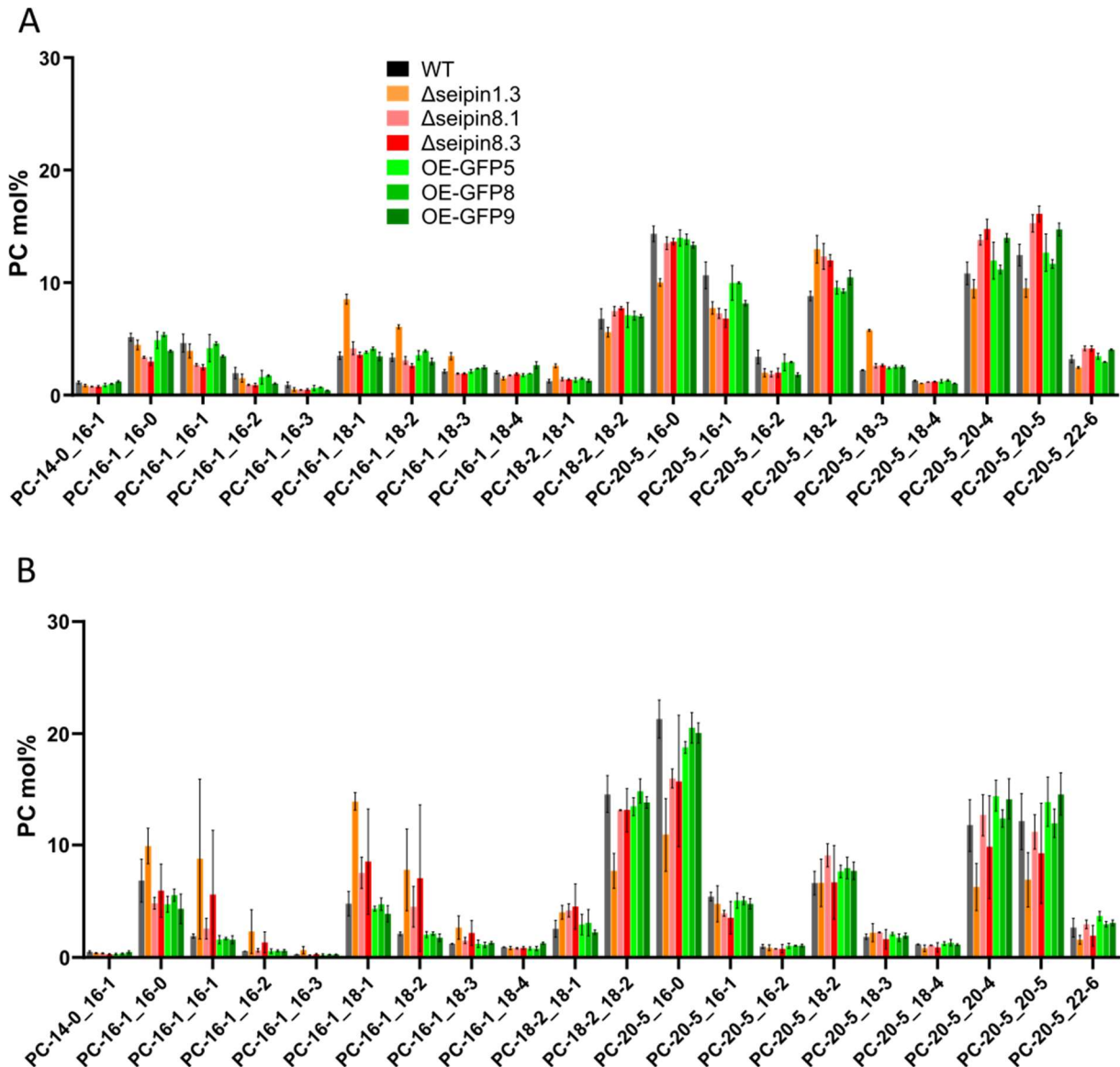
**Figure 65 : Profil des triacylglycerols (TAG) dans les différentes lignées.** Condition de culture normale (A) ou de forte lumière (B). Trois réplicats biologiques par lignées sont représentés par la valeur médiane, les barres d'erreurs représentent les valeurs minimale et maximale.

Les répartitions des TAG entre les lignées mutantes et la lignée sauvage ne présentent pas beaucoup de différences, on relève principalement une abondance plus importante des TAG 16:0\_16:0\_16:1 et 16:0\_18:1\_16:0 et une diminution des espèces de TAG qui contiennent du 20:5. En d'autres termes,

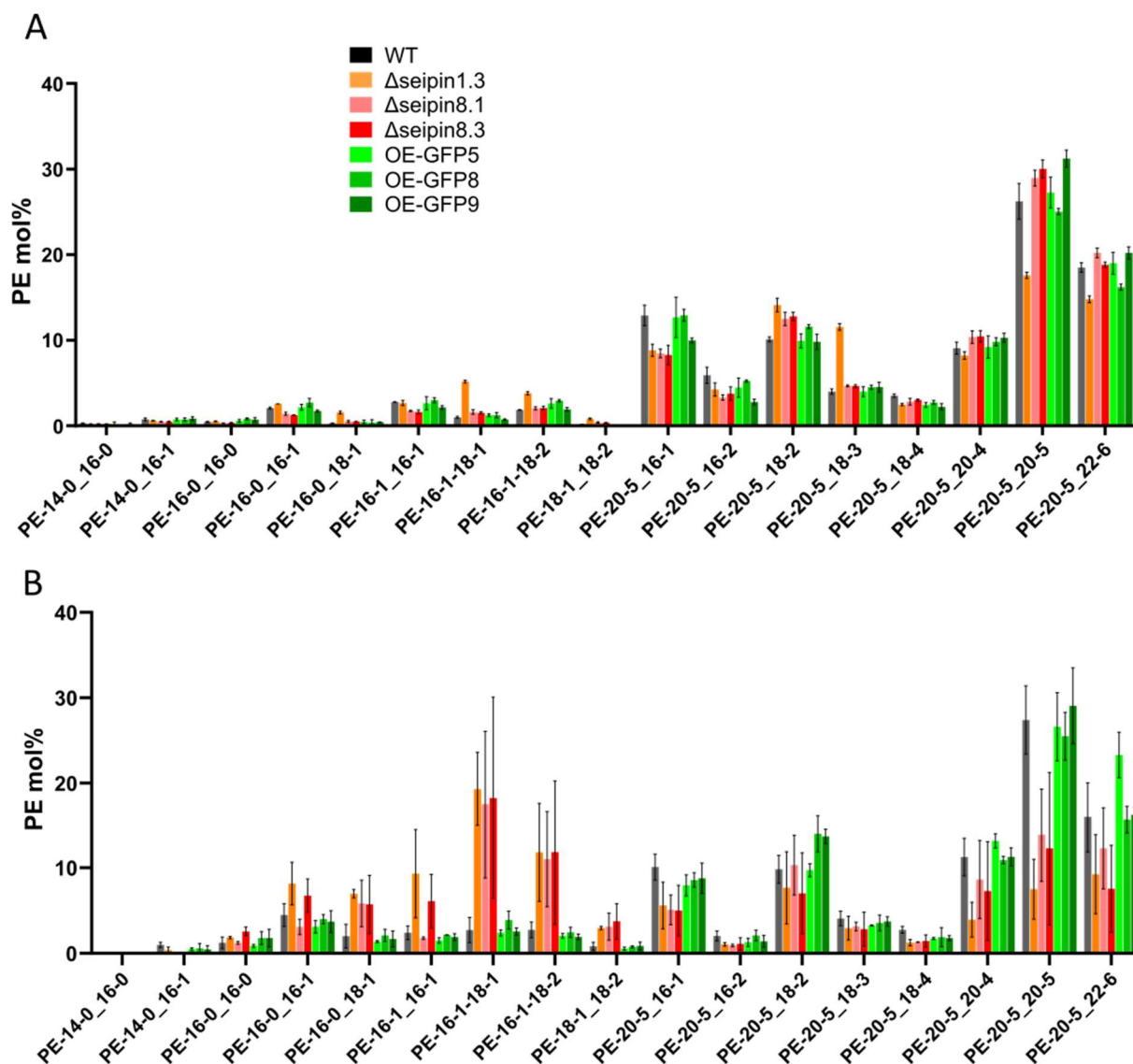
ce sont principalement des TAG comprenant au moins deux acides gras de 16 carbones (C16:X) et un VLC-PUFA (C20:5) dont les proportions diminuent chez les mutants KO.

### 5.3.2 Profils des Phospholipides

Des différences importantes dans la composition de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidylethanolamine (PE) ont pu être relevées entre lignées mutantes KO et lignée surexprimeurs. Les autres phospholipides ne sont pas présentés, car aucune différence significative n'a été observée.



**Figure 66 : Profil de la phosphatidylcholine (PC) dans les différentes lignées.** Condition de culture normale (A) ou de forte lumière (B). Trois répliquats biologiques par lignées sont représentés par la valeur médiane, les barres d'erreurs représentent les valeurs minimale et maximale.



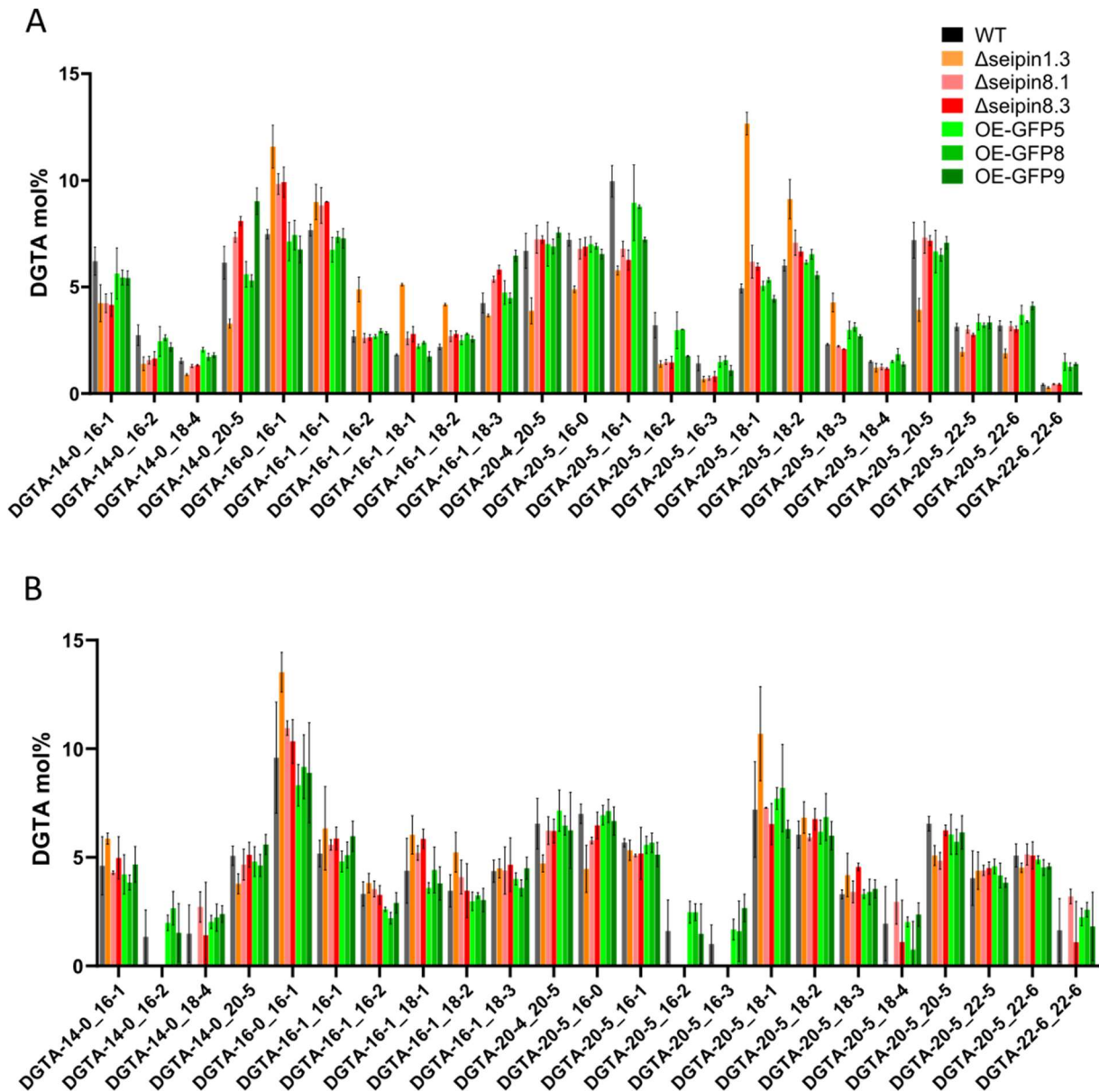
**Figure 67 : Profil de la phosphatidylethanolamine (PE) dans les différentes lignées.** Condition de culture normale (A) ou de forte lumière (B). Trois réplicats biologiques par lignées sont représentés par la valeur médiane, les barres d'erreurs représentent les valeurs minimale et maximale.

Une signature particulière des mutants KO Seipin dans la composition de la PC et de la PE émerge des **Figure 66** et **Figure 67**.

De manière récurrente, et quasiment systématique dans les cellules cultivées sous forte lumière, on observe chez les KO une augmentation des PE et PC qui ont une combinaison d'acides gras à 16 ou 18 carbones. En revanche, les classes de PE ou PC avec au moins un acide gras à très longue chaîne poly insaturée C20:5 et dont le deuxième acide gras possède 16 carbones sont majoritairement diminués. En revanche, on constate que les PE et PC de la forme 20:5\_18:2 20:5\_18:3 ou 20:5\_18:4 sont très peu perturbés par rapport à leurs homologues avec 16 carbones.

### 5.3.3 Profils du DGTA

Des différences dans la composition du seul bétaine lipide présent chez *Phaeodactylum tricornutum* sont montrées **Figure 68**.



**Figure 68 : Profil du DGTA dans les différentes lignées.** Condition de culture normale (A) ou de forte lumière (B). Trois réplicats biologiques par lignées sont représentés par la valeur médiane, les barres d'erreurs représentent les valeurs minimale et maximale.

Après 8 jours de culture, on relève des différences chez les KO. On constate en condition de culture normale une augmentation relative pour le DGTA 16:0\_16:1, 16:1\_16:1, 20:5\_18:1, 20:5\_18:2 ainsi qu'une diminution dans le DGTA 20:5\_16:1, 20:5\_16:2, 20:5\_16:3. Ces deux dernières espèces (20:5\_16:2, 20:5\_16:3) ne sont même plus détectées en condition de forte lumière chez les mutants tout comme le DGTA 14:0\_16:2.

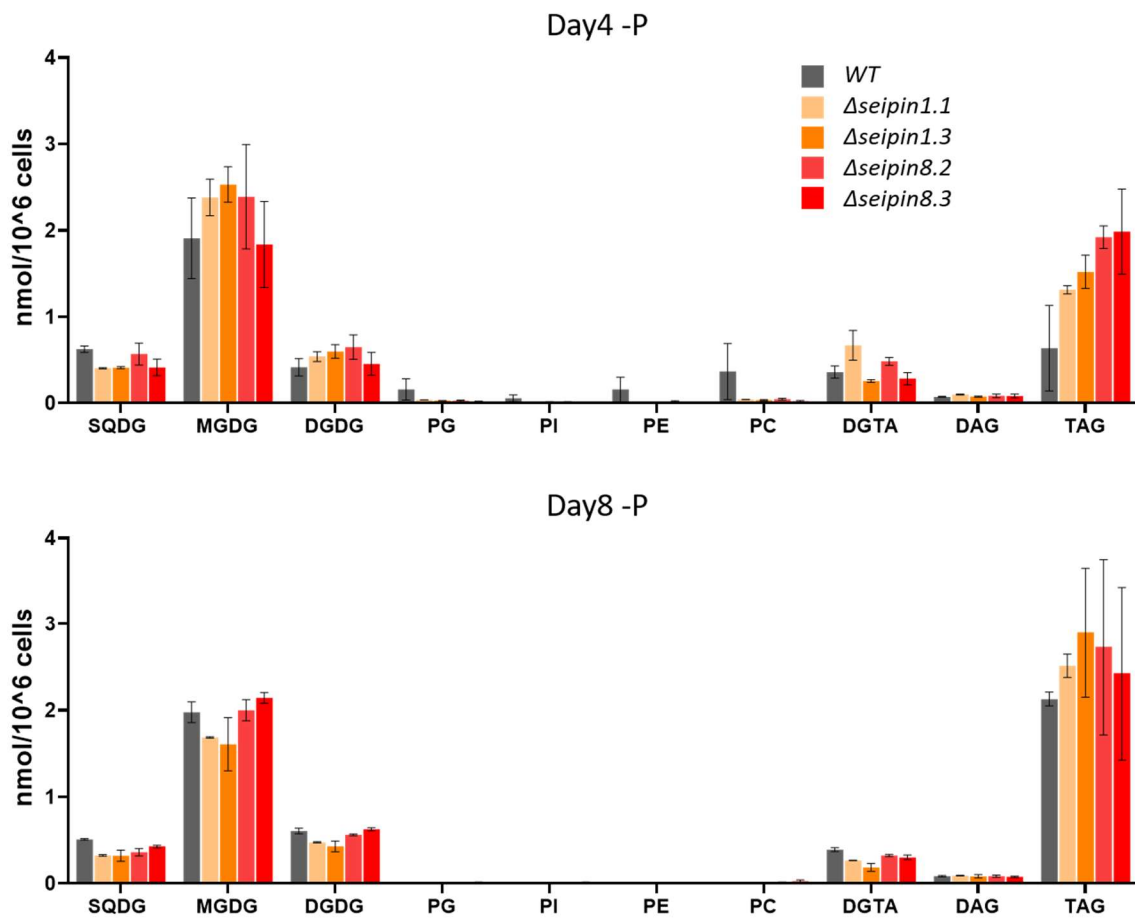
Deux espèces de DGTA étaient retrouvées enrichies à la surface des LD en condition de carence en azote, DGTA 20:5\_16:1 et 20:5\_16:2 (Lupette *et al.*, 2019). On constate ici chez les mutants KO Seipin qu'ils sont diminués ce qui permet de questionner le rôle de la Seipin dans la synthèse et dans la répartition de ces espèces précises de lipides.

## 6 Impact du stress nutritionnel à travers une carence en phosphate chez les mutants KO Seipin

Le phosphate est un élément nutritionnel limitant dans le cycle de vie des diatomées qui y sont régulièrement soumises lors de carences. Différents mécanismes sont alors déployés par la cellule pour y faire face tant au niveau de la transcription que de l'expression de protéines (Yang *et al.*, 2014; Abida *et al.*, 2015; Cruz de Carvalho *et al.*, 2016; Dell'Aquila and Maier, 2020). La carence en phosphate (-P) entraîne un arrêt de la division cellulaire et une accumulation d'huile tout comme la carence en azote (-N) (Abida *et al.*, 2015). Cependant, la dynamique avec laquelle s'installe la carence -P est bien plus lente, de l'ordre de plusieurs jours alors que la carence en -N s'installe en quelques heures. Nous avons ainsi choisi d'évaluer l'effet de la mutation Seipin sur la dynamique de formation des LD en -P, car nous craignons que des différences n'apparaissent trop rapidement pour être observées en -N.

De plus, en exploitant les données de transcriptomique disponibles publiquement *via* la base de donnée DiatOmicBase (<https://www.diatomicsbase.bio.ens.psl.eu/>), nous avons trouvé que le gène codant Seipin était régulé de manière positive seulement après 8 jours de carence en phosphate (Cruz de Carvalho *et al.*, 2016).

## 6.1 Profils des glycérolipides totaux en carence en phosphate

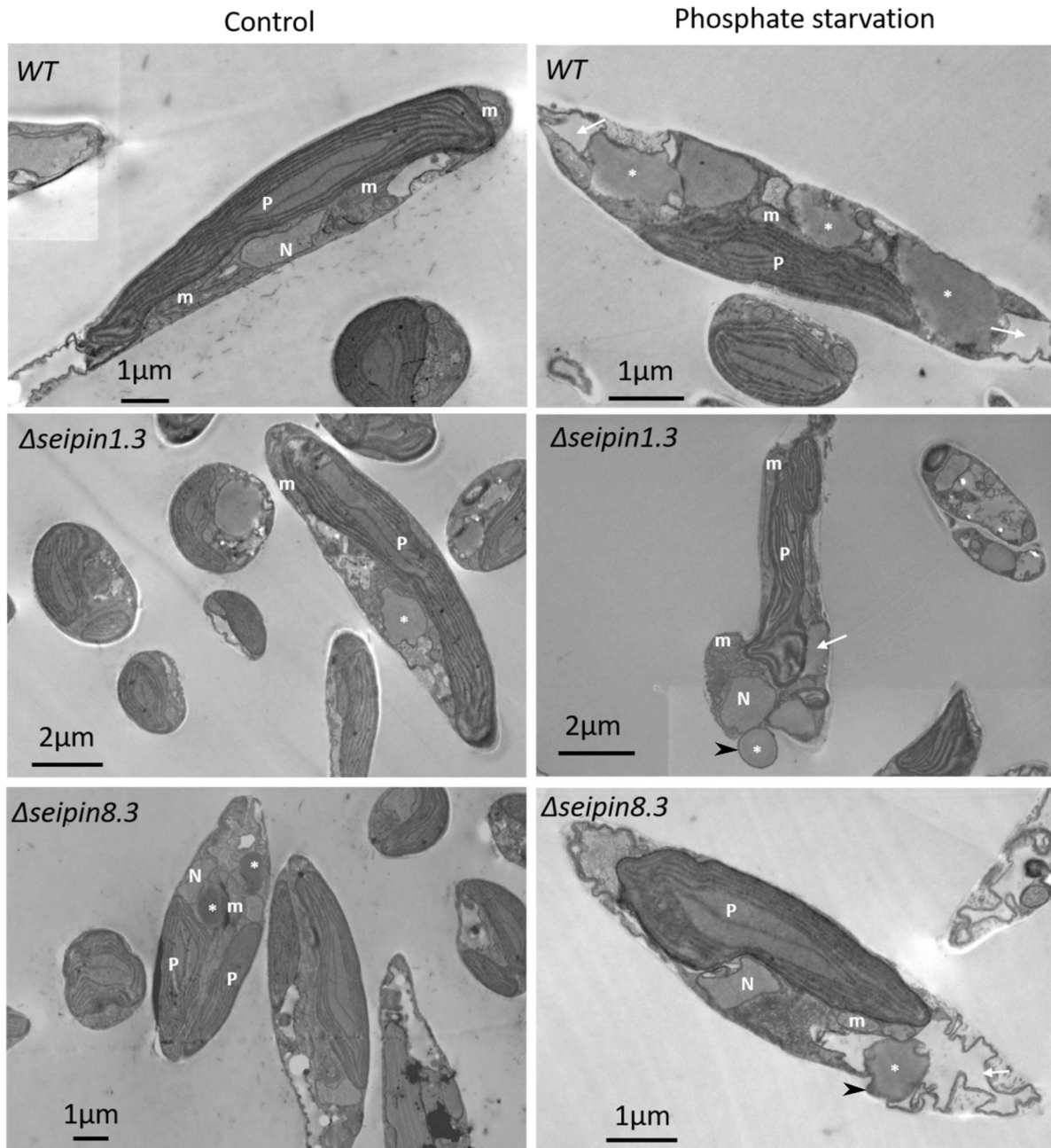


**Figure 69 : Profils des classes de glycérolipides après 4 ou 8 jours de carence en phosphate.** Profils des glycérolipides des lignées sauvages (WT) et KO Seipin cultivés en milieu carencé en phosphate pendant 4 jours (Haut) ou 8 jours (Bas). Les profils sont donnés en nmol par millions de cellules. Barres d'erreurs : min et max, n = 2

Lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu carencé en phosphate, on constate une perte totale des phospholipides dès 4 jours pour toutes les lignées mutantes. Dans cette expérience, un des réplicats biologiques pour la lignée sauvage est encore pourvu de phospholipides après 4 jours. Au bout de 8 jours plus aucune lignée n'en possède.

On constate dans le même temps que la dynamique d'accumulation des TAG est différente entre les lignées KO et la souche sauvage. Toutes les lignées mutantes en accumulent de manière plus importante à 4 jours, montrant ainsi une sensibilité plus forte du mutant à la carence en phosphate.

On constate que les glycérolipides composant les membranes du plaste sont très préservés pendant la carence en phosphate.



**Figure 70 : Observation des structures intracellulaires des cellules cultivées en condition de carence en phosphate.** Observations en microscopie électronique (fixation chimique) des lignées WT et mutantes  $\Delta seipin1.3$  et  $\Delta seipin8.3$  cultivées pendant 8 jours en condition de culture normale (gauche) ou de carence en phosphate (droite). N : Noyau, P : Plaste, m : mitochondrie, \* : gouttelettes lipidiques. En condition de carence en phosphate, des structures probablement vacuolaires sont indiquées par une flèche blanche. Les LD qui semblent prêtes à être expulsées sont indiquées par une tête de flèche noire.

Des images de microscopie électronique en transmission ont été acquises après fixation chimique en condition de carence de phosphate. On peut observer en condition -P dans toutes les lignées de larges structures peu denses aux électrons (**Figure 70A**), correspondant probablement à des vacuoles. En condition -P un remodelage lipidique important intervient en recyclant les

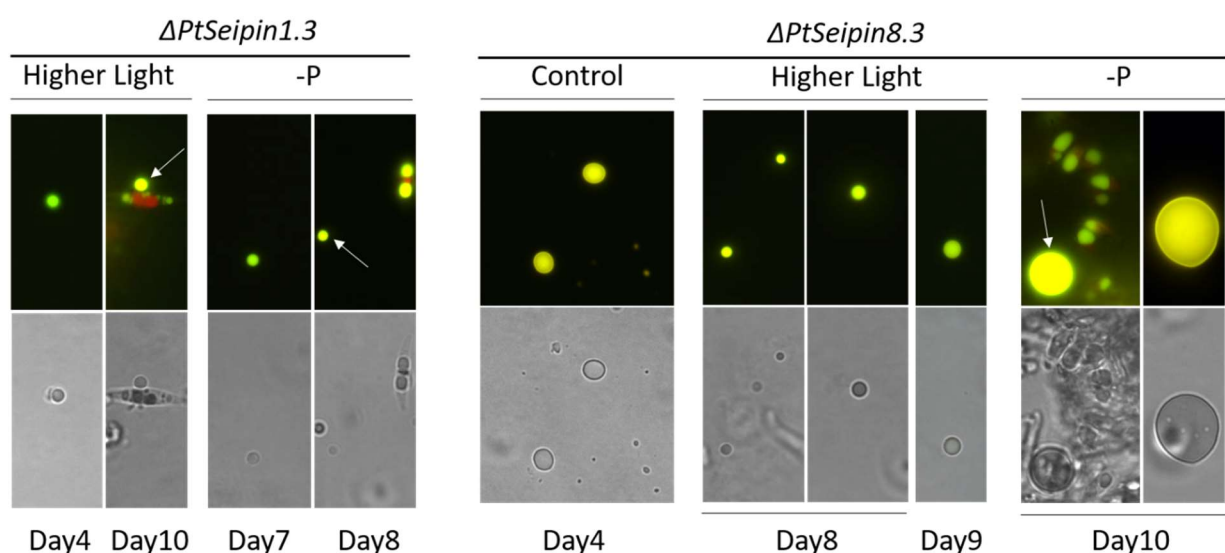
phospholipides (**Figure 69**) et ces structures pourraient y participer. On constate également que de nombreuses membranes du système endomembranaire sont beaucoup moins bien définies et très désorganisées ce qui s'explique probablement par le remplacement des phospholipides par d'autres lipides membranaires (notamment DGTA). Les structures des organites énergétiques de la cellule (plaste et mitochondries) sont, en revanche, préservées.

Enfin, on relève sur les deux images présentées de mutants Seipin cultivées en -P que les LD semblent très proches de la membrane plasmique de la cellule quasiment au point d'être expulsées par la cellule (flèches noires, **Figure 70**). Ces évènements n'étaient pas observés chez le sauvage. Il est probable qu'en l'absence de la Seipin, les LD ne soient plus ancrées efficacement au système endomembranaire comme cela a été montré entre le RE et la LD chez l'Homme (Salo *et al.*, 2016) ou chez la levure (Grippa *et al.*, 2015). Il a notamment été montré que la vélocité des LD mesurée à travers des mouvements brownien était plus importante chez les KO Seipin et que les LD ne semblaient plus connectées aux microtubules (Salo *et al.*, 2016).

## 7 Expulsion de gouttelettes lipidiques chez les mutants Seipin

Au cours des observations microscopiques réalisées en routine pour contrôle des expérimentations menées dans ce chapitre, il a été constaté à plusieurs reprises que des gouttelettes lipidiques semblaient flotter librement dans le milieu de culture, hors cellule. Les paragraphes suivants rapportent ces observations, ainsi que des quantifications de TAGs dans les surnageants de culture.

### 7.1 Observation de gouttelettes lipidiques libres dans le milieu de culture



**Figure 71 : Observation de gouttelettes lipidiques extracellulaires chez les mutants KO Seipin cultivées dans différentes conditions et observées à différents jours de culture.** Observations en microscopie à épifluorescence. En haut : gouttelettes lipidiques marquées au rouge de Nil en jaune ; l'autofluorescence du plaste apparaît en rouge. Lorsqu'au moins une cellule est présente sur l'image,

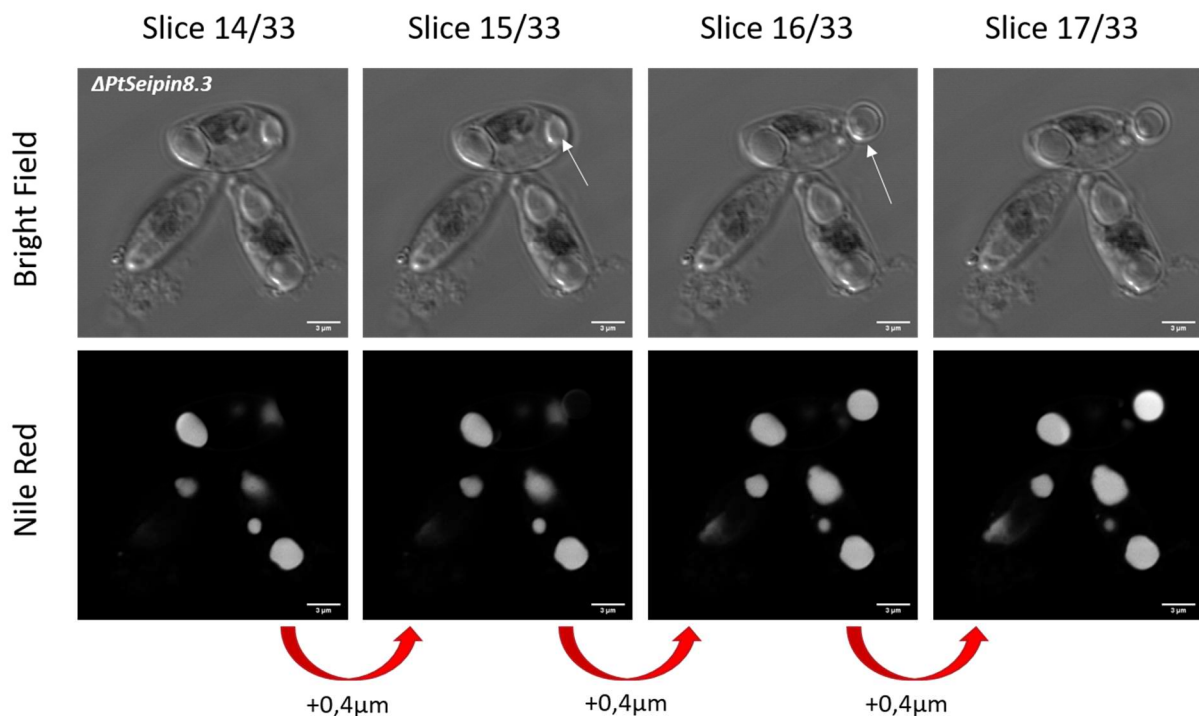


la gouttelette lipidique libre dans le milieu de culture est indiquée par une flèche. « Control » : cellules cultivées en condition contrôle telles que décrites dans le matériel et méthode, « higher light » : cellules cultivées sous forte lumière et « -P » : cellules cultivées en milieu carencé en phosphate.

Les LD flottant dans le milieu de culture sont observées chez les mutants KO Seipin comme présenté **Figure 71** dans plusieurs conditions et à différents jours lors de cinétiques de culture. Il est assez étonnant de relever la taille de certaines LD après plusieurs jours de carence en phosphate. Ces LD surdimensionnées proviennent probablement de la fusion de plusieurs autres LD.

### 7.2 Observation de l'expulsion de gouttelettes lipidiques hors de la cellule

Le mécanisme précis par lequel ces LD sont expulsées hors de la cellule n'est pas établie et peuvent avoir lieu par défaut de la division cellulaire, par sécrétion hors de la cellule ou par contraintes mécaniques (centrifugation par exemple). Néanmoins, un évènement d'expulsion en direct depuis une cellule a pu être observé au cours d'une acquisition en microscopie confocale.



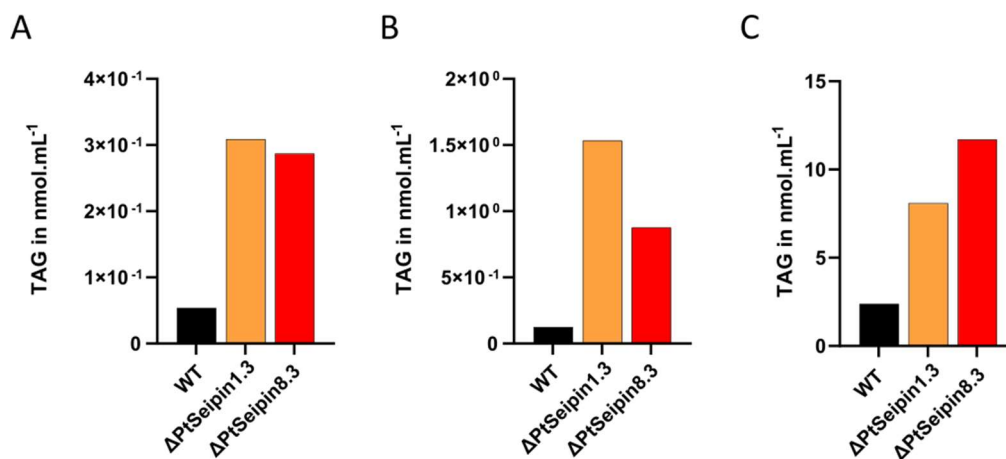
**Figure 72 : Observation de l'expulsion d'une gouttelette lipidique hors d'une cellule chez un mutant KO Seipin.** Quatre images de microscopie confocale sont représentées, de gauche à droite variation du plan focal observé de  $0,4\mu\text{m}$  selon l'axe z. Haut : images en champ clair. Bas : canal de fluorescence du rouge de Nil. La cellule observée était cultivée en condition de forte lumière et récoltée au jour 4 de culture. L'expulsion de la gouttelette a eu lieu entre l'acquisition des images 15/33 et 16/33. Sur ces images, la gouttelette d'abord visualisée à l'intérieur de la cellule, puis hors de la cellule, est indiquée par une flèche.

On constate à travers les quelques images de microscopie confocale présentées **Figure 72**, que l'expulsion de la gouttelette s'est faite sur un temps très court, la durée entre deux acquisitions étant comprise entre 10 et 15 secondes. Le mécanisme ayant permis l'expulsion de la gouttelette repose

probablement sur des paramètres physiques de pression. Nous pouvons suspecter que la variation de pression exercée par l'objectif à immersion d'huile du microscope sur la lame de microscopie au moment de changer de plan focal, a pu être suffisante pour permettre l'expulsion de cette gouttelette. En soutien à cette hypothèse, j'ai pu également observer et reproduire cette expulsion de gouttelettes sous un microscope optique de laboratoire à champ droit (Zeiss AxioScope) en exerçant volontairement une pression sur la lamelle à l'aide d'une pointe en métal (non présenté ici, car non capturé par contrainte technique).

### 7.3 Analyses lipidiques du surnageant de culture.

Afin de quantifier l'expulsion de LD dans le milieu, nous avons procédé à une extraction de lipides à partir du surnageant de culture ainsi qu'à une analyse des lipides comme décrit précédemment.



**Figure 73 : Quantité de TAG présents dans les surnageants par millilitre (mL) de culture.** Les surnageants de triplicatas de culture ont été réunis pour extraction liquide-liquide. Les surnageants ont été récoltés après 15 jours de culture cellulaire. (A) condition de culture normale, (B) condition de forte lumière, (C) condition de carence en phosphate.

Dans les trois conditions de culture testées (culture normale, stress lumineux et carence en phosphate), la quantité de TAG extraite à partir des surnageants de culture est plus importante chez les lignées mutantes KO Seipin. On constate également que la quantité est plus importante dans les conditions de stress lumineux ou de carence en phosphate. C'est cette dernière condition qui permet d'atteindre des quantités de TAGs très importantes.

## 8 Répartition anormale des LD lors de la division cellulaire

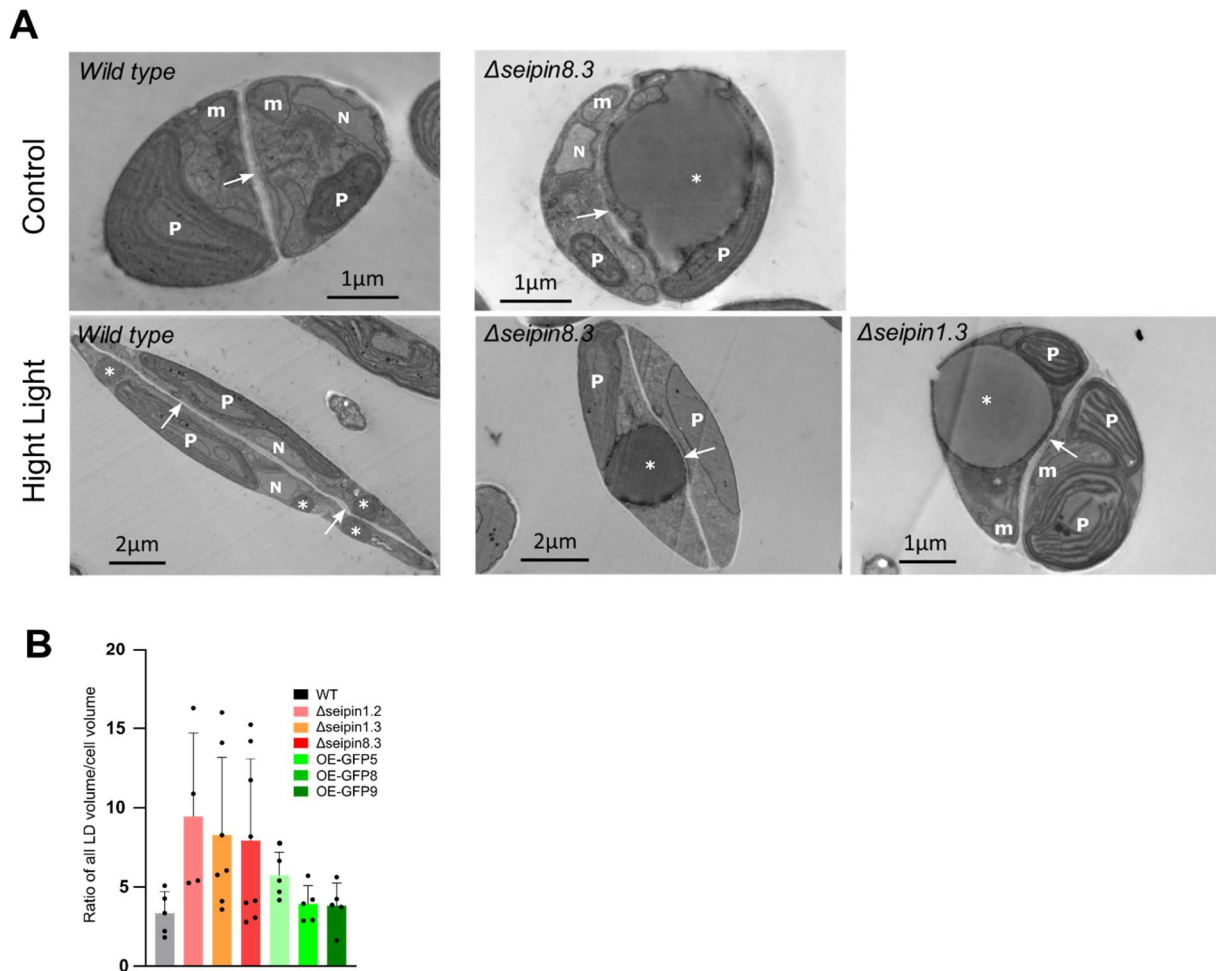
Lors de l'acquisition d'images de microscopie électronique, nous avons pu observer certaines cellules en fin de division cellulaire. Un sillon de division était visible et les cellules filles n'étaient pas encore séparées. De manière répétée, nous avons pu observer dans les lignées KO Seipin possédant des LD surdimensionnées que le sillon de division ne parvenait pas à les diviser en deux (**Figure 74A**).

Lorsque nous avons estimé le volume des LD dans des cellules, deux populations de cellules se détachent nettement chez les KO (**Figure 74B**). Une population comportant un volume de LD très importants et représentant plus de 15% du volume total de la cellule, s'oppose à une deuxième population d'un volume approximatif de 7%. Dans la cinétique de culture sous forte lumière présentée partie 4.2.2 du présent Chapitre 2, on pouvait également constater dans le diamètre de LD que deux populations se détachaient (**Figure 58**).

L'effectif très réduit du nombre de cellules prises en considération nécessitera des futures analyses impliquant un nombre plus important d'individus. Néanmoins, il semblerait que les mutants KO Seipin ne parviennent pas à diviser correctement la LD au cours de la division cellulaire et que le sillon de division la contourne. Une des cellules filles hériterait alors de la LD volumineuse et aboutirait à la population haute observée **Figure 74B** tandis que la deuxième cellule fille ne récupérerait aucune LD. Dans le WT, on observe deux LD réparties symétriquement de part et d'autre du sillon de division (**Figure 74A** – condition de forte lumière) suggérant que la division cellulaire est parvenue.

Des défauts dans la répartition de LD lors de la division cellulaire ont également été reportés dans des lignées de levures KO Seipin (Wolinski *et al.*, 2011). Des LD de toutes tailles sont concernées par ce phénomène, et ne sont pas transmises dans la cellule fille après bourgeonnement de la levure. Les auteurs ont constaté que la liaison au ER était affectée chez les mutants et que l'héritabilité dans la cellule fille pourrait être médiée par le ER.

Des investigations supplémentaires nécessitent toutefois d'être conduites dans nos travaux pour tenter 1) de confirmer que la division cellulaire ne parvient pas à diviser la LD et 2) d'en déterminer la cause. On peut supposer qu'une contrainte biophysique imposée par la taille de la LD en soit à l'origine, ou bien que d'autres mécanismes cellulaires entrent en compte.



**Figure 74 : Observations en microscopie électronique de cellules en division et répartition de LD dans une population d'algues.** (A) Observations en microscopie électronique de cellules sauvages et mutantes en division. Haut : 8 jours de culture normale. Bas : cellules cultivées sous forte lumière. N : Noyau, P : Plaste, m : mitochondrie. Les LD sont indiquées par un astérisque et le sillon de division par une flèche. Les cellules ont été fixées chimiquement. (B) : Graphique représentant le ratio entre le volume total des LD et le volume total de la cellule. Les données ont été mesurées sur des images de microscopie confocale en condition de cultures normales (*cf.* Matériel et méthodes, partie 5.1.2.1, p224). Chaque point correspond ainsi au ratio du volume total des LD présentes dans une cellule.

## 9 Discussion et conclusion du Chapitre 2

Les travaux présentés dans cette partie apportent de nombreux éléments fondamentaux sur la fonction de la Seipin de *Phaeodactylum tricornutum* (*PtSeipin*) tout en ouvrant des perspectives d'applications intéressantes. Ces travaux sont à notre connaissance les premiers portant sur la recherche de fonction complète de la Seipin chez une diatomée. Les travaux de Lu *et al.*, 2017 ont, en effet, porté sur la caractérisation de *PtSeipin* uniquement par des approches de surexpression. De plus, les auteurs ont probablement mené leurs expériences en phase de carence nutritionnelle avancée. Nous avons souhaité compléter ces travaux par une approche d'étude fonctionnelle plus complète notamment en évaluant l'impact de la mutation de *PtSeipin* à différents points de cinétique et sous différents stress.

### 9.1 Impact de *PtSeipin* sur le métabolisme lipidique

Dans un premier temps, nous avons cherché à restaurer le phénotype causé par la perte de la Seipin de levure par *PtSeipin*. Nous avons ainsi réussi à y restaurer la taille et la forme des LD par complémentation. En revanche, nous avons pu constater des différences dans les profils lipidiques entre les lignées complémentées par *PtSeipin* par rapport aux lignées complémentées par *AtSeipin3* et *ScSeipin*. Dans leurs travaux, Cai *et al.*, 2015, n'observent pas de différences lorsqu'ils complémentent par *AtSeipin3*. Cela nous a encouragé à caractériser plus en profondeur la Seipin chez *P.tricornutum*.

Les analyses fonctionnelles chez la diatomée ont révélé un effet très fort dans les lignées KO : la taille des LD y est significativement plus grande tandis que leur nombre par cellules est réduit, et ce phénotype est accentué en condition de stress. Ces paramètres morphologiques sont conformes à ce qui a pu être observé dans de nombreux organismes modèles comme la levure (Szymanski *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2008), le nématode *C.elegans* (Bai *et al.*, 2021) ou dans les graines de *A.thaliana* (Taurino *et al.*, 2018). En revanche, il est généralement décrit que c'est la répartition des lipides qui est affectée et qui aboutit à ces LD surdimensionnées au lieu de plusieurs petites LD. En réalité, l'accumulation de TAG est observée dans des modèles et dans des lignées cellulaires non adipeux/oléagineux (Fei *et al.*, 2008; Fei, Li, *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011).

*P.tricornutum* est un modèle de microalgue oléagineuse accumulant naturellement des quantités importantes de TAG. La suraccumulation de ces molécules dans les mutants KO Seipin est un élément assez unique dans un modèle oléagineux et suppose qu'elle est intimement liée au métabolisme des lipides. Nous avons d'abord supposé que ces TAG pouvaient provenir d'une synthèse déstabilisée et tirée dans le sens de la production. La synthèse de TAG peut se faire de deux manières : 1) la néo synthèse par la voie dite de Kennedy avec comme substrat initial un squelette glycérol-3-phosphate (G3P) sur lequel des acides gras sont successivement estérifiés augmentant ainsi la quantité totale de lipides et 2) la voie de recyclage des glycérolipides membranaires. Les lipides membranaires sont utilisés comme substrat et l'hydrolyse puis le transfert de leur chaîne d'acides gras vers un DAG permet de former des TAG sans affecter la balance et la production nette de glycérolipides.

Nous avons pu constater notamment en condition de stress, une accumulation de lipides totaux chez les lignées mutantes (**Figure 63**) avec néanmoins une variabilité importante entre réplicats, ce qui peut soutenir l'hypothèse que la néo synthèse de lipides soit accentuée chez les mutants Seipin. En soutien à cette hypothèse, nos données montrent que les profils relatifs de TAG sont légèrement enrichis en acides gras néo synthétisés (riches en TAG 16:0 et 16:1) au détriment des TAG

comprenant au moins un VLF-PUFA issu de processus supplémentaires d'élongations/désaturation (TAG 20:5\_16:X\_16:X).

Cependant, nous avons également pu constater des différences dans la composition des phospholipides PE et PC notamment en condition de forte lumière avec un enrichissement relatif des PE et PC 16:X\_18:X et une diminution globale des espèces contenant du 20:5. Récemment, une phospholipid:DAG acyltransferase a été rapportée chez *Nannochloropsis oceanica* (Yang *et al.*, 2022). Cette enzyme est localisée sur la membrane externe périplastidiale lorsqu'elle est exprimée en système hétérologue chez *P.tricornutum*. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse et le transfert des acides gras 16:0, 16:1 et 18:1 en position *sn*-2 depuis la PE vers un DAG pour former un TAG et une accumulation de ces espèces (16:0, 16:1 et 18:1) sont observées dans les KO chez *N.oceanica*. De manière très spéculative, au vu de la signature d'accumulation des espèces de phospholipides (PE et PC) composés exclusivement de courtes chaînes d'acides gras en condition de stress (**Figure 66**, **Figure 67**), un effet indirect de la Seipin à travers une enzyme de type PDAT peut être envisagé. Un isoforme putatif de la PDAT chez *P.tricornutum* (Phatr3\_J8860) a été identifié, mais n'a pas encore été caractérisé fonctionnellement (Zienkiewicz *et al.*, 2016). Enfin, une dernière possibilité dans l'accumulation des TAG relèverait de troubles dans la remobilisation des lipides neutres stockés dans la LD. Ce scénario d'une accumulation de TAG indirecte est discuté dans le Chapitre 3 et dans la partie Proposition d'un modèle de fonctionnement de *PtSeipin* et discussion générale, page 196.

## 9.2 Impact de la Seipin sur l'orchestration de la division des LD au cours de la mitose

Au cours de nos expériences nous avons pu constater plusieurs comportements anormaux concernant les LD chez les mutants KO.

Il semblerait que les lignées mutantes ne parviennent pas à diviser correctement la LD et à la répartir entre deux cellules filles lors de la division. Cela pourrait être dû à une déstabilisation de la liaison entre la LD et certains organites comme le RE ou bien le cytosquelette par exemple.

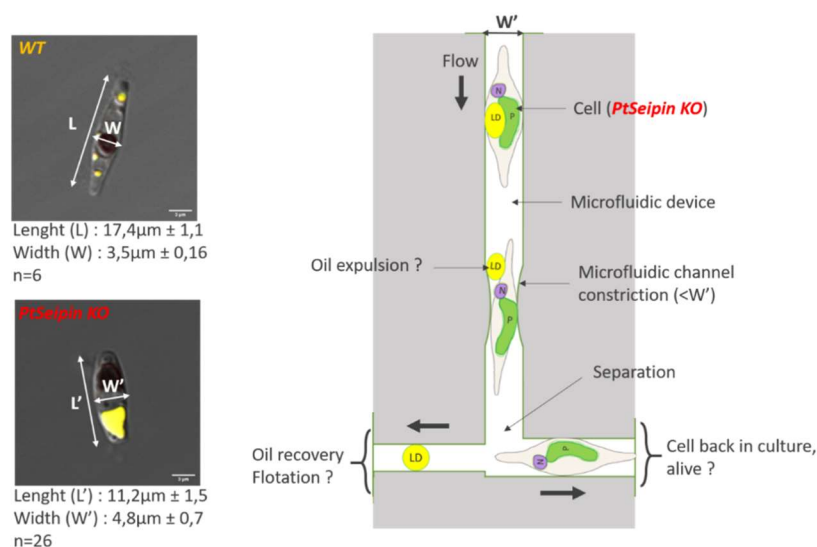
Les dosages de lipides dans les surnageants de cultures ont révélé un enrichissement de TAG hors des cellules et de manière beaucoup plus importante en condition de stress, surtout lors de la carence nutritionnelle en phosphate. Dans cette dernière condition, les membranes sont très déstabilisées en raison d'un recyclage important de phospholipides membranaires. Nous avons pu observer en microscopie électronique des LD très proches de la membrane plasmique. La libération de LD pourrait donc se faire de façon spontanée. Par ailleurs, l'expulsion d'une LD a été observée lors d'une acquisition de microscopie optique. Il paraîtrait très probable que dans ce cas, l'expulsion de LD par la cellule ait été provoquée par une contrainte mécanique sur la paroi cellulaire : par pression de l'objectif sur les cellules placées entre lame et lamelles. De même, la centrifugation lors de la

récolte des culots cellulaires avant analyses pourrait provoquer cette contrainte mécanique et permettre la libération de LD. Quoiqu'il en soit, les mutants y semblent plus sensibles.

### 9.3 Perspectives d'applications industrielles

Plusieurs aspects des travaux que nous avons présentés dans ce chapitre nous ont semblé très prometteurs dans le cadre de la recherche sur la production des biocarburants. Les verrous majeurs actuels ne permettant pas encore aux biocarburants de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> générations (respectivement utilisation et amélioration génétique de souches de micro-organismes) d'être économiquement compétitifs sont principalement 1) productivité des souches sélectionnées, 2) balance entre biomasse et production de composés d'intérêts, 3) énergie utilisée lors de l'extraction des composés d'intérêt.

Les mutants *PtSeipin* présentent ainsi plusieurs aspects très intéressants en réponse aux verrous évoqués. Ils accumulent des quantités de TAG plus importantes que les lignées sauvages, notamment en condition de stress lumineux (1). Le stress lumineux ne bloque pas complètement la croissance des cellules contrairement aux stress en azote habituellement utilisés pour favoriser la production de TAG (2). Enfin, les cellules semblent expulser naturellement leur huile lorsqu'un stress mécanique est appliqué ce qui peut être exploité par exemple, à travers des dispositifs micro fluidiques contraignant le passage des cellules dans des capillaires (**Figure 75**) (3). Des expériences plus approfondies devront être menées afin de déterminer si les algues sont toujours vivantes après avoir expulsé leur gouttelette lipidique, et si elles peuvent être placées de nouveau en culture pour un autre cycle d'accumulation. Ces points ont été valorisés par le dépôt d'une demande de brevet international auprès de l'OEB.



**Figure 75 : Proposition d'un modèle micro-fluidique pour l'extraction d'huile à partir de mutants *PtSeipin* KO.** WT, Souche sauvage ; L, Longueur de la cellule ; W, Largeur de la cellule ; LD, Gouttelette lipidique.

**Chapitre 3 : Fractionnement, analyse des profils  
lipidomiques et protéomiques des LD chez les mutants  
Seipin.**





## Préambule

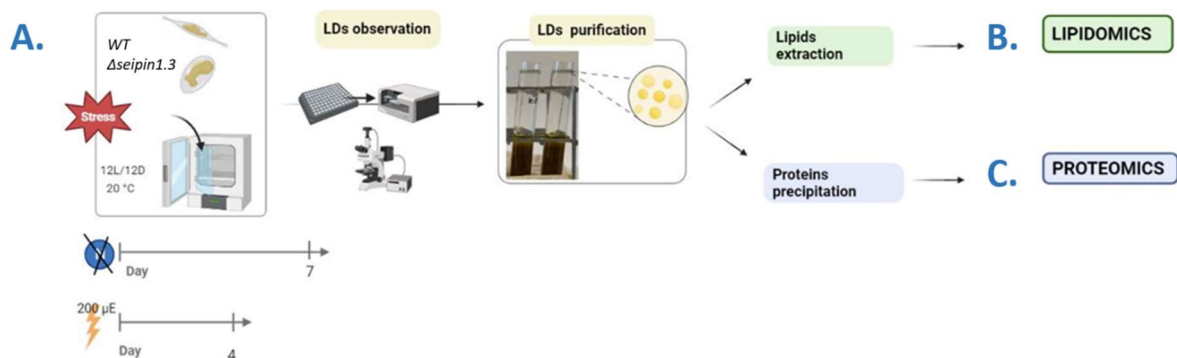
Nous avons pu constater dans le Chapitre 2 que les mutants KO Seipin *Phaeodactylum tricornutum* accumulaient des TAGs de manière spectaculaire par rapport aux autres organismes dont la Seipin a été caractérisée fonctionnellement. De nombreux travaux montrent que la protéine Seipin recrute activement des partenaires protéiques qui se révèlent essentiels dans la biogénèse de la LD (Chung *et al.*, 2019; Coulon *et al.*, 2020; Pyc *et al.*, 2021) (*cf.* Introduction La protéine Seipin, partie 3, p84), cependant, rien n'est pour le moment connu à ce propos chez *P.tricornutum*.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à comparer la composition et l'équipement protéique des LD chez les mutants KO Seipin par rapport à la souche sauvage. Nous avons utilisé deux conditions distinctes pour induire la formation de LD : une carence en azote et la condition de forte lumière présentée et utilisée dans les expérimentations du Chapitre 2. La première a été largement utilisée dans la littérature pour induire l'accumulation de TAG et plusieurs protéomes des LD ont été publiés dans cette condition (Yoneda *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Lupette *et al.*, 2019; Leyland, Boussiba and Khozin-Goldberg, 2020) ; nous avons identifié la seconde comme induisant des différences majeures dans l'accumulation de TAG chez les mutants Seipin.

### 1 Purification des LD

Afin d'étudier le lipidome et le protéome des LD, leur purification a été réalisée sur gradient de sucrose (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 5.2, p226) selon le protocole mis au point au laboratoire par Josselin Lupette (Lupette, 2018). Les LD ont été récupérées par flottaison au sommet du gradient de saccharose après ultracentrifugation sur la nuit. Trois purifications indépendantes ont été réalisées pour chaque condition à partir de cellules sauvages et de la lignée mutante  $\Delta seipin1.3$ , traitées en parallèle.

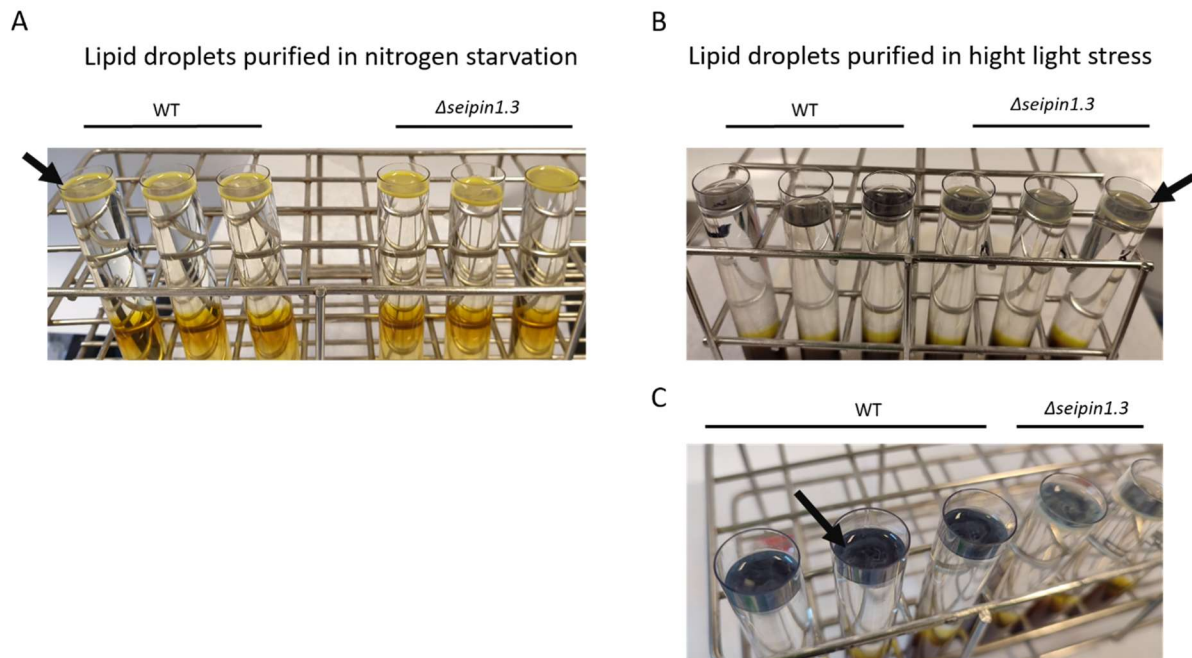
Un résumé graphique de la méthodologie employée est présenté **Figure 76**.



**Figure 76 : Résumé graphique de la méthodologie employée pour la purification et l'étude des LD.** (A) : Les cellules sauvages (WT) ou KO Seipin ( $\Delta seipin1.3$ ) sont cultivées pendant plusieurs jours sous deux conditions de stress (carence N, stress lumineux) différentes avant purification sur

gradient de saccharose. Les LD récoltées par flottaison au sommet du gradient sont divisées en deux fractions pour les analyses de lipidomiques (B) ou de protéomiques (C). Graphique réalisé par Francesca Arici dans le cadre de son stage de Master 2.

### 1.1 Validation de la purification



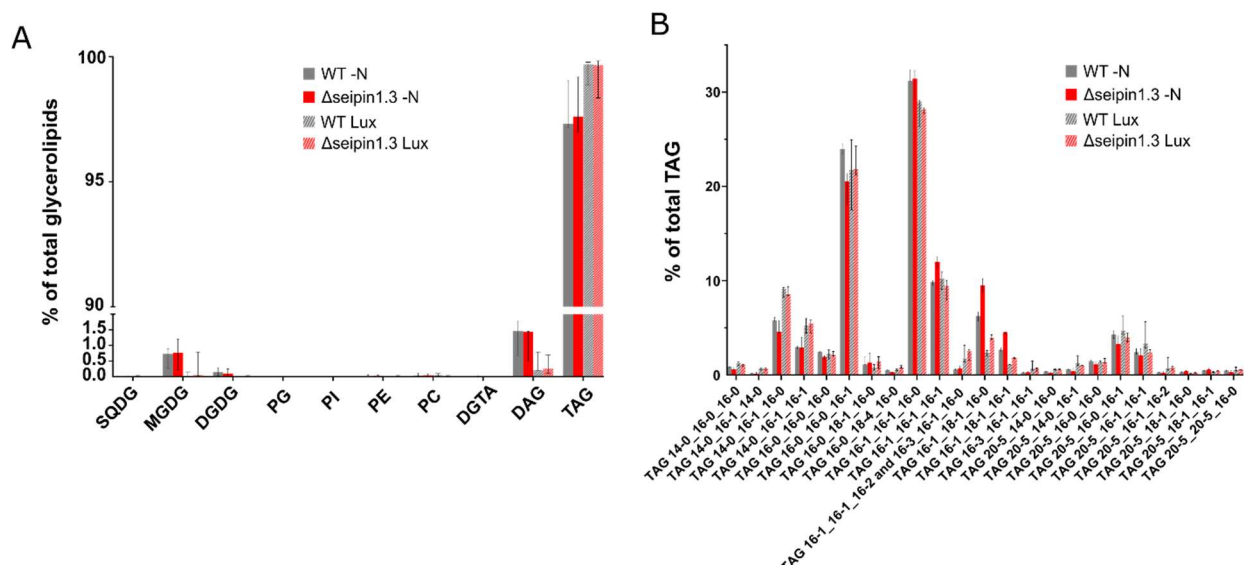
**Figure 77 : Photographies des LD purifiées au sommet du gradient saccharose après ultracentrifugation.** Les images proposées rendent compte d’une seule expérience parmi les trois réalisées de purification des LD en condition de carence en azote (A) ou bien de forte lumière (B) et (C). Les couches de LD au sommet du gradient ciblé par une flèche noire sont précautionneusement prélevées à la pipette pasteur.

La **Figure 77** montre l’aspect du gradient saccharose après ultracentrifugation. On observe à leurs sommets une couche d’aspect huileuse, conséquente en condition de carence en azote (**Figure 77A**), moins importante en condition de forte lumière (**Figure 77B**). Dans cette deuxième condition, on constate davantage d’huile purifiée chez  $\Delta seipin1.3$  que chez le sauvage. Ces différences reflètent directement les quantités de LD accumulées *in vivo* que l’on a pu observer précédemment (Chapitre 2, parties 4 et 5). Au vu des plus faibles quantités purifiées chez la souche sauvage en condition de forte lumière et par crainte de perdre plus de matériel biologique, nous avons décidé de ne pas réaliser le dernier lavage effectué dans le protocole de purification utilisé par Lupette *et al.*, 2019 sur lequel nous nous sommes appuyés.

## 2 Analyses lipidomiques des LD purifiées

Les lipides des fractions réservées aux analyses lipidomiques (**Figure 76B**) ont été extraits par la méthode de Bligh & Dyer, puis soumis aux analyses telles que décrites dans le Matériel et méthodes partie 6.3.

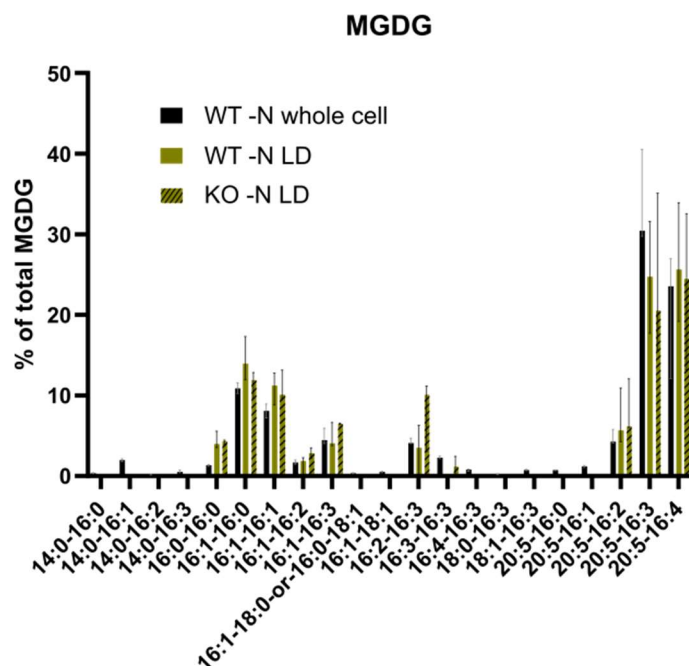
## 2.1 Profils des glycérolipides



**Figure 78 : Profils des glycérolipides totaux dans les LD purifiées.** (A) Profil des classes de glycérolipides exprimées en pourcentage des glycérolipides totaux. (B) Profil des espèces de TAG en mol%. Echantillons -N : carences en azote. Echantillons lux : forte lumière. Barplot : médiane, barres d'erreurs : min. et max. n=3

Le profil total des classes de glycérolipides montre une quantité relative comprise entre 97 et 99% de TAG (**Figure 78A**) ce qui conforte la pureté du matériel purifié et un très fort enrichissement en LD. En effet, nous craignons une contamination par les plastoglobules (LD dont la biogenèse a lieu dans les plastes notamment observés en condition de stress lumineux) dans la lignée sauvage. La quantité de LD y étant plus faible (voir Chapitre 2) et la quantité d'huile purifiée moins importante (voir **Figure 77**), une contamination aurait pu devenir significative. Seulement des traces (< 0,5%) de MGDG y sont détectées au même niveau que le mutant, ce qui nous conforte dans l'efficacité de la purification. On relève aussi la présence de traces de MGDG et de DAG, dans les échantillons purifiés après carence en azote (respectivement 0,5 et 1,5%).

Lorsque l'on compare les profils des TAG, on constate des différences dans les espèces majoritaires entre conditions de cultures mais assez peu entre la lignée sauvage et  $\Delta seipin1.3$  (**Figure 78B**). Ainsi, on observe une augmentation relative des deux espèces de TAG 14:0\_16:1\_16:X dans les échantillons -N et des espèces de types 16:1\_18:1\_16:X et 16:1\_16:1\_16:0 dans les fortes lumières. De manière récurrente, les espèces en triple 16:X sont proportionnellement plus importantes chez  $\Delta seipin1.3$  comparé au sauvage en forte lumière.



**Figure 79 : Profils des MGDG dans les cellules entières ou dans les LD en condition de carence en azote.** Le profil de MGDG totaux à l'échelle de la cellule entière pour la souche sauvage est représenté en noir, tandis que les profils de MGDG dans les fractions des LD purifiées sont représentés en vert foncé.

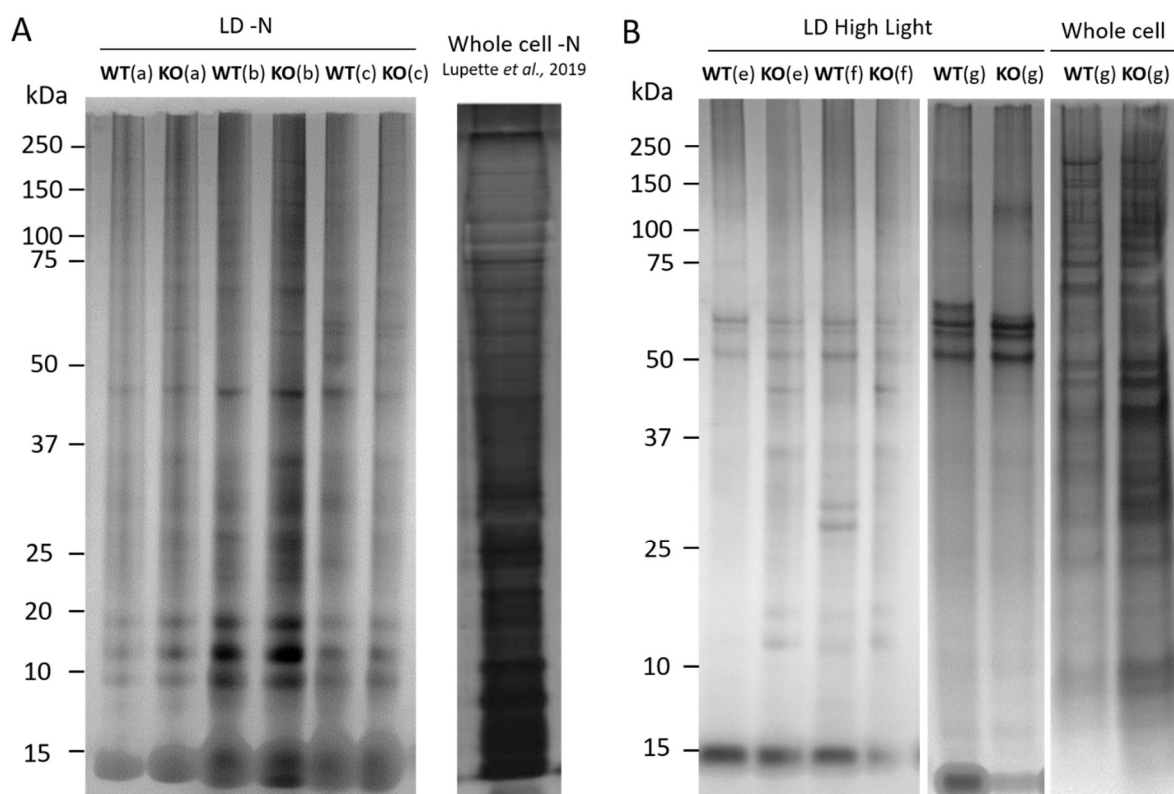
Les espèces composant le MGDG co-détecté avec les LD purifiées en carence en azote ont également été analysées (**Figure 79**). Lorsque l'on compare les espèces de MGDG dans les fractions purifiées de LD (en vert) à un profil de MGDG total de cellules sauvages cultivées en carence d'azote (en noir), on peut constater qu'ils sont extrêmement similaires. Cette donnée ne nous permet pas d'exclure une contamination très mineure par le plaste. Elle reste néanmoins extrêmement faible, les MGDG ne représentent ici que 0,5% des glycérolipides totaux alors qu'ils représentent entre 30 et 40% à l'échelle d'une cellule entière.

### 3 Analyses protéomiques des LD purifiées, approches biochimiques

Les protéines des fractions réservées aux analyses protéomiques (**Figure 76C**) ont été précipitées en présence d'acétone puis traitées comme décrit dans le Matériel et Méthodes, partie 7.1.2.

#### 3.1 Colorations au nitrate d'argent

Des volumes compris entre 3 et 12 $\mu$ L (voir Matériel et Méthodes **Tableau 11**) ont été utilisés pour la migration sur un gel dénaturant suivi d'une coloration au nitrate d'argent permettant de visualiser les profils protéiques. Ces volumes ont été déterminés arbitrairement après avoir estimé la quantité de matériel purifié à la surface du gradient de saccharose (par exemple, différence de matériel entre sauvage et mutant  *$\Delta$ seipin1.3* en forte lumière, voir **Figure 77 B et C**).



**Figure 80 : Coloration au nitrate d'argent des protéines précipitées à partir des LD purifiées et après migration sur gel dénaturant (SDS-Page).** (A) : carence en azote. (B) condition de forte lumière. WT : souche sauvage, KO : lignée mutante *Δseipin1.3*. Whole cell : cellule entière. Les lettres entre parenthèses correspondent chacune à une purification indépendante.

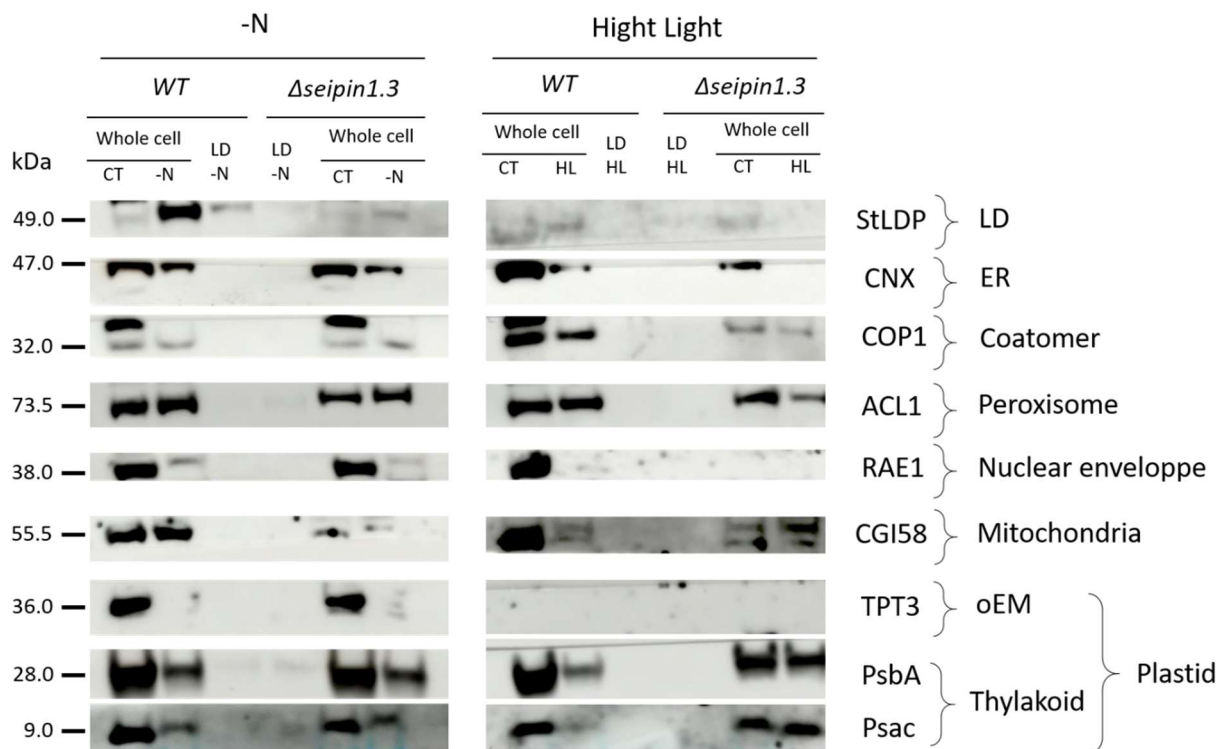
On constate que les profils des protéines en condition de carence en azote semblent plus riches qu'en condition de forte lumière, avec peu de différences entre sauvage et mutant. En condition de forte lumière, on retrouve un profil de trois bandes caractéristiques autour de 50kDa et au-dessus, qui semblent représenter une signature des LD purifiées dans cette condition. Néanmoins, d'autres bandes sont présentes dans certaines purifications uniquement, ce qui nous a encouragé pour les études non ciblées de protéomique en spectrométrie de masse à nous focaliser uniquement sur les signaux communs entre les 3 réplicats pour chaque lignée.

Ces colorations au nitrate d'argent ont notamment été cruciales pour estimer les quantités relatives de protéines dans chaque échantillon afin d'en injecter des quantités similaires en spectrométrie de masse (voir Matériel et Méthodes **Tableau 11**, p233).

### 3.2 Immunodétection sur membrane

Une partie des fractions réservées aux analyses protéomiques ont été utilisées pour une analyse en immunomarquage avec divers anticorps dirigés contre des protéines de la LD (*StLDP*), du réticulum endoplasmique (*CNX*), des vésicules de transports couvertes par les coatomères (*COP1*), du peroxisome (*ACL1*), de l'enveloppe nucléaire (*RAE1*), de la mitochondrie (*CGI58*), des thylakoïdes

(PsbA et Psac) ainsi que de l'enveloppe externe du plaste (TPT3), afin de vérifier la pureté des purifications de LD.



**Figure 81 : Immunodétection par Western Blot des fractions purifiées de LD.** Pour les échantillons de protéines issues de cellules entières 1µg ont été déposés sur gel, tandis que des quantités correspondantes au maximum de matériel disponible après protéomique, ont été utilisées pour les échantillons de gouttelettes lipidiques. La liste des anticorps et des dilutions utilisées sont présentés dans le Matériel et Méthodes **Tableau 12**. -N : condition de carence en azote, CT : condition de culture normale, Hight Light : condition de plus forte lumière, WT : lignée sauvage, *Δseipin1.3* : lignée mutante Seipin, whole cell : extrait protéique à partir de cellules entières, LD -N : extrait protéique à partir de LD purifiées en carence en azote, LD HL : extrait protéique à partir de LD purifiées en forte lumière.

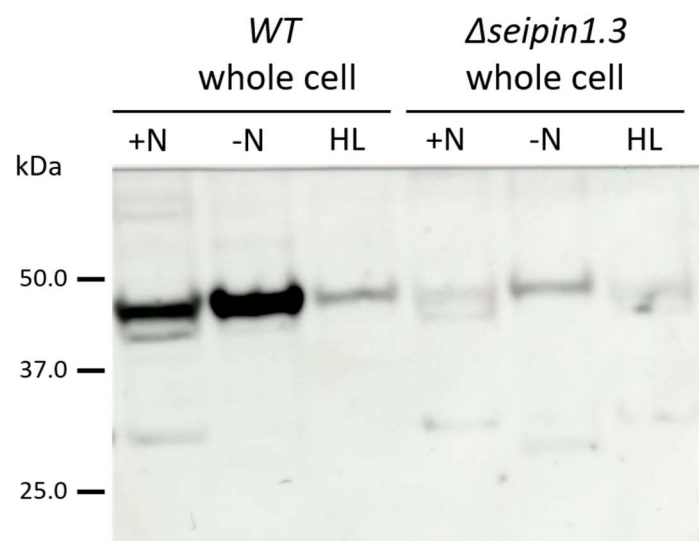
La pureté des LD a été analysée à partir d'anticorps spécifiques de plusieurs compartiments cellulaires. StLDP (LD), CNX (Reticulum endoplasmique), COP1 (coatomère), ACL1 (Peroxisome), RAE1 (enveloppe nucléaire), CGI-58 (mitochondrie), TPT3 (Plaste – enveloppe externe), PsbA et Psac (Plaste – thylakoid).

On peut constater dans les fractions correspondant aux protéines précipitées à partir des LD purifiées, aucun signal fort n'est relevé lorsque l'on cible des protéines appartenant à d'autres d'organites que la LD (**Figure 81**).

On relève toutefois un très faible signal dans la fraction LD pour les deux protéines des photosystèmes I et II : PsbA et Psac. En revanche, il semblerait qu'elles soient en contrepartie moins abondantes dans les extraits totaux en carence en azote comparé à la condition de culture normale. Ces deux protéines font respectivement parties des photosystèmes II et I (PSII et PSI). Les lignées mutantes PsbA ont été rapportées comme affectées dans la chaîne de transport des électrons au

sein du PSII (Materna *et al.*, 2009). PsaC est également impliqué dans le transport des électrons, et en est le dernier accepteur dans le PSI (Nymark *et al.*, 2023). Nous pouvons considérer que ces protéines traduisent une contamination résiduelle d'éléments plastidiaux.

De manière similaire à ce qui a été précédemment rapporté, on détecte la protéine StLDP enrichie dans la fraction cellulaire en condition de carence en azote chez le sauvage (**Figure 81**). Il s'agit de la protéine majoritaire et unique marqueur avéré des LD (Yoneda *et al.*, 2016; Lupette *et al.*, 2019; Leyland *et al.*, 2020). Dans les fractions LD purifiées, on constate qu'on ne la détecte presque plus chez les mutants Seipin, et que son abondance semble extrêmement réduite à l'échelle de la cellule entière. Afin de confirmer ces résultats, des quantités identiques (2,5µg) de protéines extraites de cellules cultivées dans différentes conditions ont été déposées sur gel. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, la détection par anti-StLDP a été réalisée (**Figure 82**). On constate, en effet, que la protéine est plus abondante chez la souche sauvage en carence en azote (-N). Dans la lignée *Δseipin1.3*, son abondance est fortement diminuée dans toutes les conditions comparées à la souche sauvage.



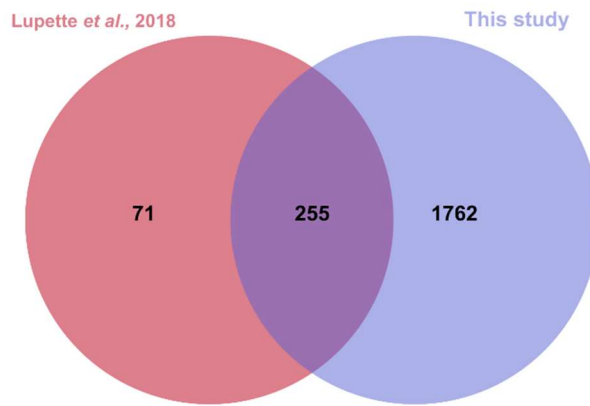
**Figure 82 : Immunodétection par Western Blot de la StLDP dans les fractions cellulaires de protéines totales.** 15µg de protéines extraites des cellules entières ont été déposées sur gel pour migration et détection par l'anticorps anti-StLDP. WT : souche sauvage. +N et -N respectivement condition normale et carencé en azote. HL : forte lumière.

#### 4 Analyses protéomiques des LD purifiées par spectrométrie de masse

##### 4.1 Nombre de protéines détectées par spectrométrie de masse

Les analyses protéomiques non ciblées conduites sur la plateforme EDyP (IRIG, CEA, Grenoble) ont permis de détecter un total de 2017 protéines, tous échantillons confondus. Dans un premier temps, nous avons comparé cette diversité protéique avec les travaux publiés précédemment.





**Figure 83 : Diagramme de Venn comparant le nombre total de protéines détectées précédemment (Lupette *et al.*, 2018) avec notre étude.** Parmi les 326 protéines de LD détectées par Lupette *et al.*, 2018, 255 sont communes avec notre étude. 1762 protéines sont uniquement détectées dans nos travaux.

Nous avons pu identifier que 78% (255 protéines) des protéines de LD de *Phaeodactylum tricornutum* sauvage cultivées en carence d'azote et identifiées précédemment au laboratoire (Lupette *et al.*, 2019) sont en commun avec nos données. Cette quantité plus importante de protéines que nous avons détectées peut relever de plusieurs facteurs : 1) les rendements de purification étaient importants, notamment en condition de carence en azote, ce qui nous a très certainement permis de détecter des protéines peu abondantes précédemment sous le seuil de détection, 2) nous n'avons pas réalisé le dernier lavage après purification sur gradient saccharose, car nous avons pu constater au cours de travaux préliminaires une perte importante de matériel à cette étape. Cela nous a certainement permis de conserver un cortège protéique riche associé à la LD. Nous pouvons ainsi supposer par exemple que des protéines de type II (c'est-à-dire des protéines directement adressées depuis le cytosol à la LD) sont potentiellement conservées et détectées dans notre étude. 3) Deux conditions de cultures ont été utilisées ; des protéines communes aux deux stress combinées à des protéines spécifiques d'un stress en particulier aboutissent certainement à une diversité plus importante. 4) Les filtres appliqués pour le traitement des données ne sont pas les mêmes, nous avons cherché ici à comparer des abondances relatives entre des échantillons ou des conditions. 5) Enfin, l'abondance peut être due à des contaminations par des protéines d'autres compartiments. Ce dernier point n'est pas à exclure, notamment par une éventuelle contamination du plaste au regard des profils de MGDG présents dans les LD purifiées (**Figure 79**) et des protéines des photosystèmes (**Figure 81**).

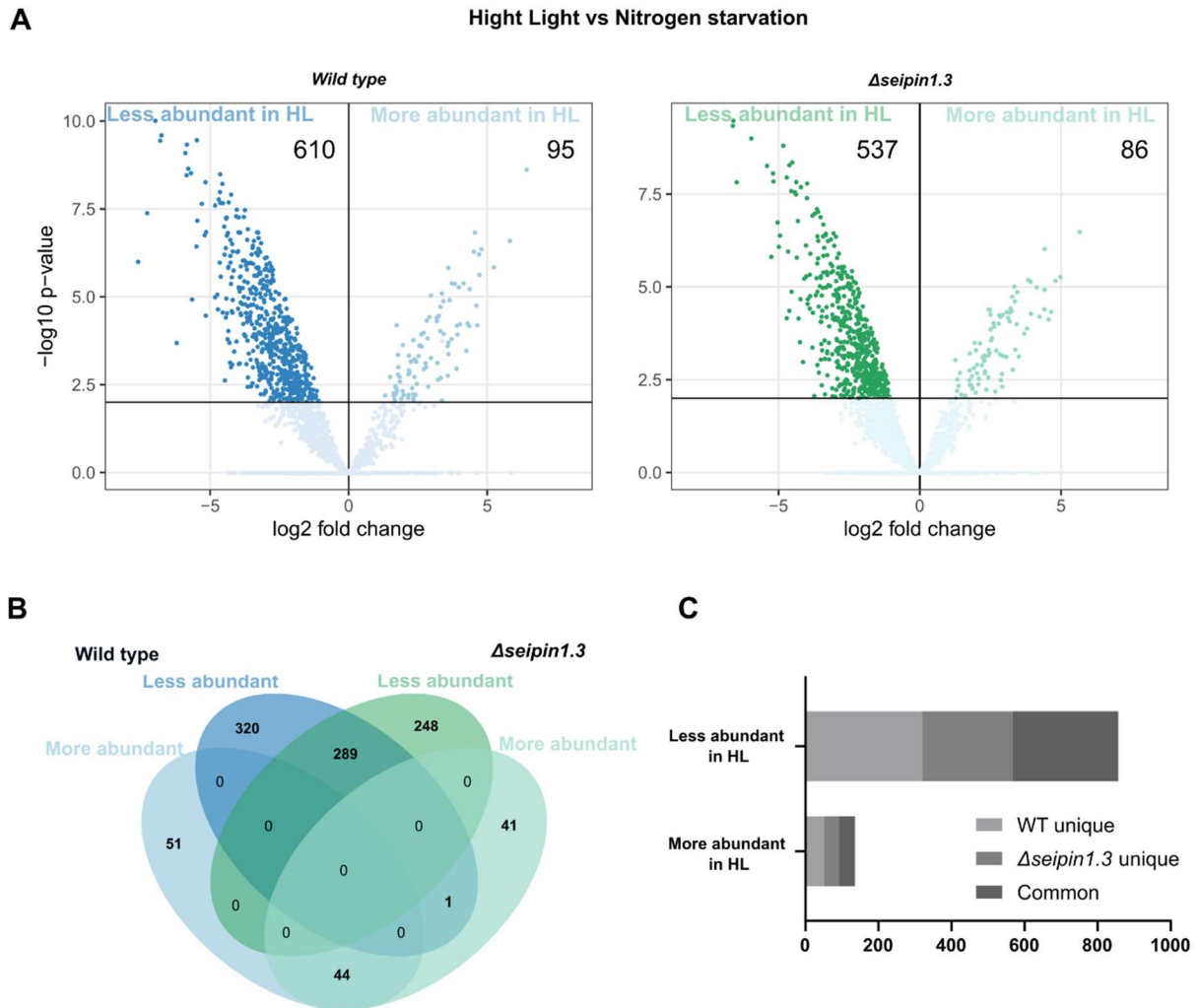
#### 4.2 Les différences de composition les plus importantes sont liées aux conditions de culture

L'abondance relative des protéines est déterminée pour chaque échantillon. La valeur de « FoldChange » est calculée en divisant les abondances dans une condition X par rapport à une

condition Y. En appliquant une représentation logarithmique (Log2), on reflète un enrichissement ( $[\log_2(\text{FC})] > 1$ ) ou une diminution ( $[\log_2(\text{FC})] < -1$ ). Ainsi une valeur de FoldChange positive traduit une protéine enrichie, tandis qu'une valeur négative traduit une protéine dont l'abondance est diminuée. Lors du traitement des données, différents filtres ont été appliqués (voir Matériel et Méthodes) permettant d'augmenter la confiance accordée à la significativité des protéines retenues. Un calcul statistique basé sur un test de Limma est également appliqué entre l'abondance de chaque protéine entre deux conditions. Le seuil de significativité est fixé lorsque la p-value  $< 0,01$ .

Les résultats sont présentés sous la forme de Volcano plots dont la lecture se fait de la manière suivante : les protéines dont l'abondance est significativement diminuée dans une condition X par rapport à une condition Y sont représentées dans la partie supérieure gauche et respectent les conditions de significativité retenues c'est-à-dire  $[\log_2(\text{FC})] < -1$  et  $\log_{10}(\text{pvalue}) > 2$ . À l'inverse, dans la partie supérieure droite on retrouve les protéines dont l'abondance est significativement enrichie dans une condition X par rapport à une condition Y et respectent les conditions de significativité retenues c'est-à-dire  $[\log_2(\text{FC})] > 1$  et  $\log_{10}(\text{pvalue}) > 2$ .

La **Figure 84** présente la comparaison entre conditions de cultures (forte lumière par rapport à la carence en azote) chez le sauvage et chez la lignée *Δseipin1.3*. La **Figure 85** présente la comparaison entre lignées (mutant *Δseipin1.3* comparé à la souche sauvage) en condition de forte lumière et en condition de carence en azote.



**Figure 84 : Abondance relative des protéines identifiées dans la condition de forte lumière par rapport à la condition de carence en azote dans la lignée sauvage et dans la lignée  $\Delta seipin1.3$ .** (A) Volcano plot des protéines enrichies ou diminuées en condition de forte lumière chez le WT (gauche) ou chez  $\Delta seipin1.3$  (droite). Pour chaque Volcano plot, les protéines significativement enrichies se trouvent dans le quart supérieur droit tandis que les protéines significativement diminuées se trouvent dans le quart supérieur gauche. (B) Diagramme de Venn montrant le recoupement entre les deux conditions. (C) Diagramme empilé du nombre de protéines plus ou moins abondantes dans la condition de forte lumière (HL) chez le sauvage uniquement (WT unique), chez le mutant uniquement ( $\Delta seipin1.3$  unique) ou bien en commun.

Les résultats présentés sur la **Figure 84** comparent les abondances protéiques des LD purifiées sous deux conditions de culture différentes chez *Phaeodactylum tricornutum*. Ces profils mettent en évidence un très grand nombre de protéines dont l'abondance est significativement diminuée en condition de forte lumière par rapport à la condition de carence en azote (610 protéines pour la souche sauvage et 537 pour  $\Delta seipin1.3$ ). Parmi ces protéines, on en dénombre 289 en commun entre la lignée sauvage et la lignée  $\Delta seipin1.3$  (**Figure 84B**).

Inversement, relativement peu de protéines se trouvent enrichies dans la condition de forte lumière, respectivement 95 et 86 pour la lignée sauvage et  $\Delta seipin1.3$  dont 44 communes.

On relève la présence surprenante d'une seule protéine qui se trouve diminuée chez le sauvage mais plus abondante chez *Δseipin1.3*. Cette protéine (Uniprot : B7FRE4, gene codant : Phatr3\_J42466) n'est pas identifiée chez *Phaeodactylum tricornutum* mais possède un orthologue chez la diatomée *Fragilariopsis cylindrus*. Elle y est prédite comme peptidyl-prolyl isomerase (<https://www.orthodb.org/?gene=B7FRE4>)

On peut se questionner sur la raison d'une telle différence dans l'abondance entre les deux conditions. Les données présentées ici reflètent qu'un grand nombre de protéines sont associées aux LD produites en condition de carence en azote, condition connue pour entraîner un arrêt de la croissance cellulaire. On peut donc émettre l'hypothèse qu'une condition de plus forte lumière entraîne la formation d'une gouttelette dont l'équipement protéique est intrinsèquement moins riche que lors d'une carence nutritionnelle comme la carence en azote. En effet, la LD est envisagée comme un organite de stockage permettant de préserver certaines protéines et molécules essentielles pour la reprise du fonctionnement cellulaire en sortie de carence nutritionnelle (Lupette *et al.*, 2019).

#### 4.3 Etude comparative de l'abondance relative de protéines chez le mutant *Seipin*

##### 4.3.1 Comparaison des profils protéiques totaux

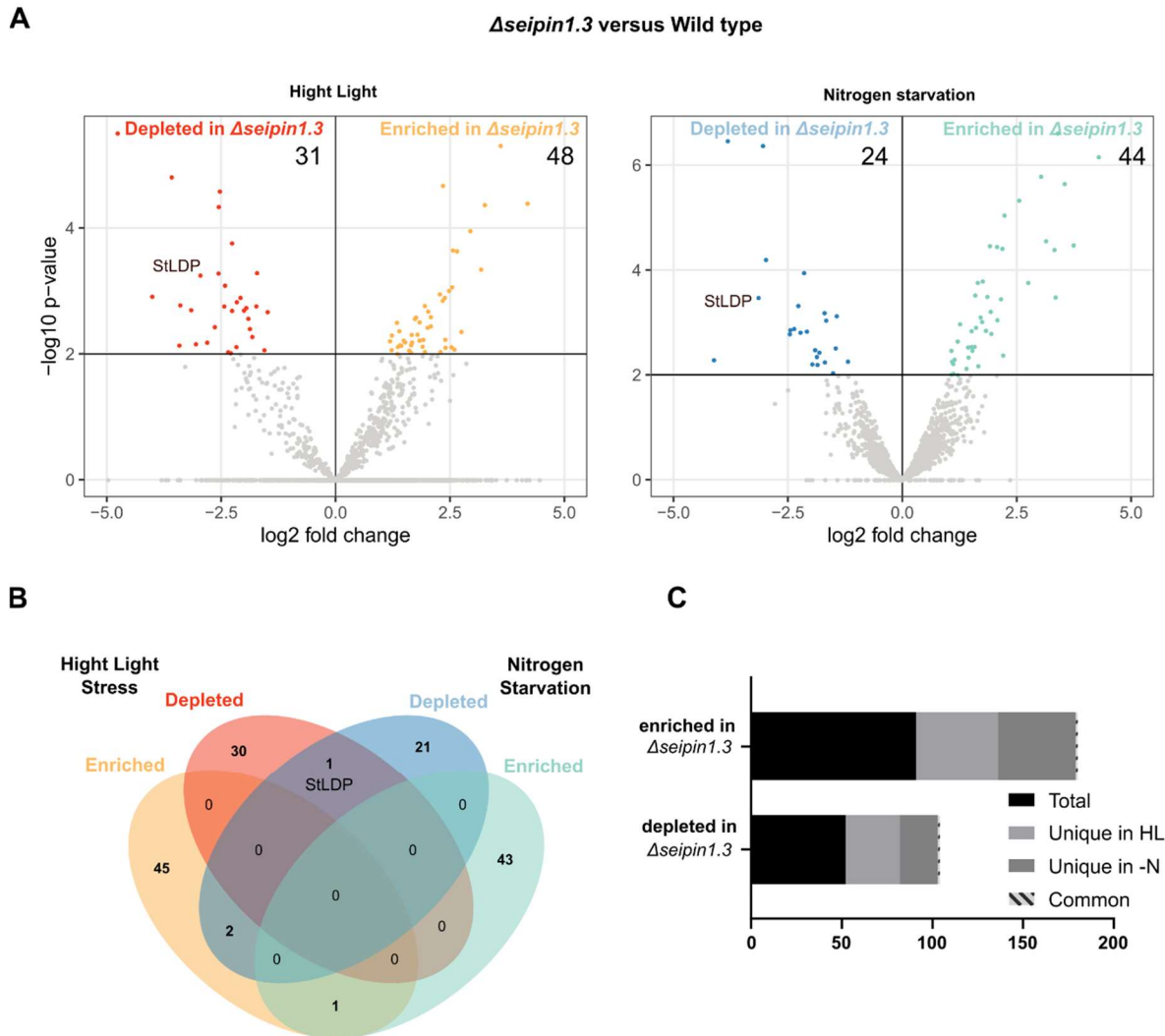
Une représentation similaire est proposée **Figure 85** en comparant cette fois-ci les protéines significativement enrichies ou diminuées chez le mutant *Δseipin1.3* comparé à la souche sauvage dans les deux conditions de stress utilisés : forte lumière et carence en azote.

On constate par rapport à la comparaison entre deux conditions de cultures (**Figure 84**), que le nombre de protéines concernées est beaucoup moins important. Ici, un nombre comparable de protéines sont enrichies ou diminuées chez *Δseipin1.3* par rapport au sauvage (**Figure 85**). Respectivement, en condition de forte lumière et de carence en azote, ce sont 45 et 43 protéines enrichies contre 30 et 21 protéines diminuées. Une seule protéine est retrouvée plus abondante en commun entre les deux conditions (Uniprot : B7FRL8). Elle n'est, par ailleurs, pas caractérisée et n'était pas présente dans le protéome établi par Lupette *et al.*, 2019.

Deux protéines sont enrichies chez le mutant en condition de stress lumineux mais diminuée en carence en azote (Uniprot : B7FXB1, et Uniprot : B7FWC4). Elles contiennent toutes les deux un domaine band-7 dont la fonction précise est peu connue. Il semblerait néanmoins que des protéines de ce type soient capables de se lier à des lipides, régulent l'assemblage et l'activité de complexe protéiques souvent liés à des microdomaines membranaires (Gehl and Sweetlove, 2014). Une de ces deux protéines était, par ailleurs, présente dans le protéome précédemment établi au laboratoire (Lupette *et al.*, 2019).

Enfin, une unique protéine voit son abondance significativement diminuée chez le mutant  $\Delta seipin1.3$  dans les deux conditions de stress : cette protéine est identifiée comme la protéine StLDP (Uniprot : B7G8M1). Pour rappel, les analyses par Western Blot (**Figure 81**) ne permettaient plus de détecter la protéine dans les LD chez le mutant Seipin.

StLDP (Stramenopile Lipid Droplet Protein) est la protéine majoritaire associée aux LD chez *Phaeodactylum tricornutum* (Yoneda *et al.*, 2016). Cette protéine de classe I est doublement localisée autour des LD ainsi qu'à la surface de la membrane externe du plaste (Yoneda *et al.*, 2023). Son étude fonctionnelle (génération de lignées KO Crispr-Cas9) montre la présence d'un nombre réduit de LD mais de taille beaucoup plus importante (Taparia *et al.*, 2021a; Yoneda *et al.*, 2023). La quantité de lipides neutres accumulés par les mutants StLDP est beaucoup plus importante. Enfin, les mutants StLDP présentent des troubles importants à remobiliser les lipides lors d'une sortie de carence nutritionnelle (Taparia *et al.*, 2021a).



**Figure 85 : Abondance relative des protéines identifiées chez le mutant *Δseipin1.3* par rapport à la lignée sauvage en condition de forte lumière et de carence en azote.** (A) Volcano plot des protéines enrichies ou diminuées chez le mutant en condition de forte lumière (gauche) ou de carence en azote (droite). Pour chaque Volcano plot, les protéines significativement enrichies se trouvent dans le quart supérieur droit tandis que les protéines significativement diminuées se trouvent dans le quart supérieur gauche. (B) Diagramme de Venn montrant le recoupement entre les conditions (C) Diagramme empilé du nombre de protéines plus ou moins abondantes dans la condition de forte lumière (HL) chez le sauvage uniquement (WT unique), chez le mutant uniquement (*Δseipin1.3* unique) ou bien en commun.

#### 4.3.2 Identification des familles de protéines exprimées différemment chez *Δseipin1.3*

Les résultats présentés **Figure 84** et **Figure 85** suggèrent que les conditions de cultures imposent une forte variabilité dans la composition du cortège protéique associé aux LD. Néanmoins, plusieurs protéines sont déstabilisées dans leur abondance chez le mutant *Δseipin1.3* (**Figure 85**).

Pour essayer de mieux comprendre comment s'organise la biogenèse des LD au niveau moléculaire en absence de la Seipin et comment pourrait être affecté le protéome dans les LD surdimensionnées

du mutant, nous avons concentré nos efforts sur l'identification des protéines dont l'abondance est significativement enrichie ou diminuée évoquées **Figure 85** en condition de carence en azote (**Figure 86** et **Tableau 4**) ou de stress lumineux (**Figure 87** et **Tableau 4**).

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des protéines dont l'abondance est significativement enrichie ou diminuée chez le mutant par rapport à la lignée sauvage dans les conditions de forte lumière ou bien de carence en azote.**

Functional classification	Biological process	Molecular fonction	Gene symbol	Gene id	Uniprot	Predicted cellular compartment	Detected Lupette et al., 2019 ?
<b>LD protein significantly enriched in <i>Δseipin1.3</i> in high light condition</b>							
Antioxydant/oxidoreductase activity	Lipid metabolic process	Oxidoreductase activity		Phatr3_J50500.p1	B7GEA6		
		Oxidoreductase activity		Phatr3_J50804.p1	B7FUG8		Yes
	amino acid metabolic process	Oxidoreductase activity		Phatr3_J1155.p1	B5Y3W5		
	Redox homeostasis	antioxydant activity/Oxidoreductase activity	Gsr_2	Phatr3_J35819.p1	B7FZC3		
		Oxidoreductase activity		Phatr3_J44770.p1	B7FVK8		
	Cell response to oxidative stress	Antioxydant/oxidoreductase activity		Phatr3_J48278.p1	B7G6K8		
	Oxydoreduction ?			Phatr3_J35627.p1	B7FYT4		
Coenzyme/ATP/energy metabolism		NADP Binding		Phatr3_J46579.p1	B7G1Q3		
		Hydrolase activity/ATP-GTP binding protein		Phatr3_J23371.p1	B7GBB5		
		NADP Binding		Phatr3_J26382.p1	B7FVE3		
		Hydrolase activity/ catalytic activity on protein/ATP-dependant		Phatr3_J10593.p1	B5Y4I2		
	Carbohydrate metabolic process	NAD binding	GapC2a	Phatr3_J29456.p1	B7G6K6		
		GTPase activity/binding	Rab2	Phatr3_J22095.p1	B7G5M5		
Lipid metabolism	DAGKc domain-containing protei	Transferase/kinase activity/ATPbinding		Phatr3_J44806.p1	B7FVQ2		
		phospholipid scramblase activity	PLS1	Phatr3_J55111.p1	B7GC30		
	Lipid metabolic process (isoprenoid)	Transferase activity		Phatr3_J49325.p1	B7GA81		
Mitochondrial metabolism	Respiratory chain	Required for the function of coenzyme Q		Phatr3_EG02408.p1	B7FR91		
	mitochondrial translation	Structural constituent ribosome		Phatr3_J44596.p1	B7FUM1		
	Respiratory chain ??			Phatr3_EG02346.p1	B7FVZ8		
	generation of precursos metabolites and energy	Transporter/transferase/oxydoreductase activity	nad6	gij 383930517 ref YP_005090323.1	F1DGM1	mitochondria	
	Photorespiration	Carbonate dehydratase activity ? Metal ion binding ?		Phatr3_EG02042.p1	B7FY50	mitochondria	
Metal/ion Binding	?	Iron starvation induced protein like		Phatr3_EG02301.p1	B7G3N9		Yes
	signaling pathways	Calcium ion binding		Phatr3_J49634.p1	B7GBA5		
	Lipid/vitamin/sulfur/carbohydrate derivative metabolic processes	Metal Ion binding/transferase activity	DXS	Phatr3_draftJ1689.p1	B7S452		



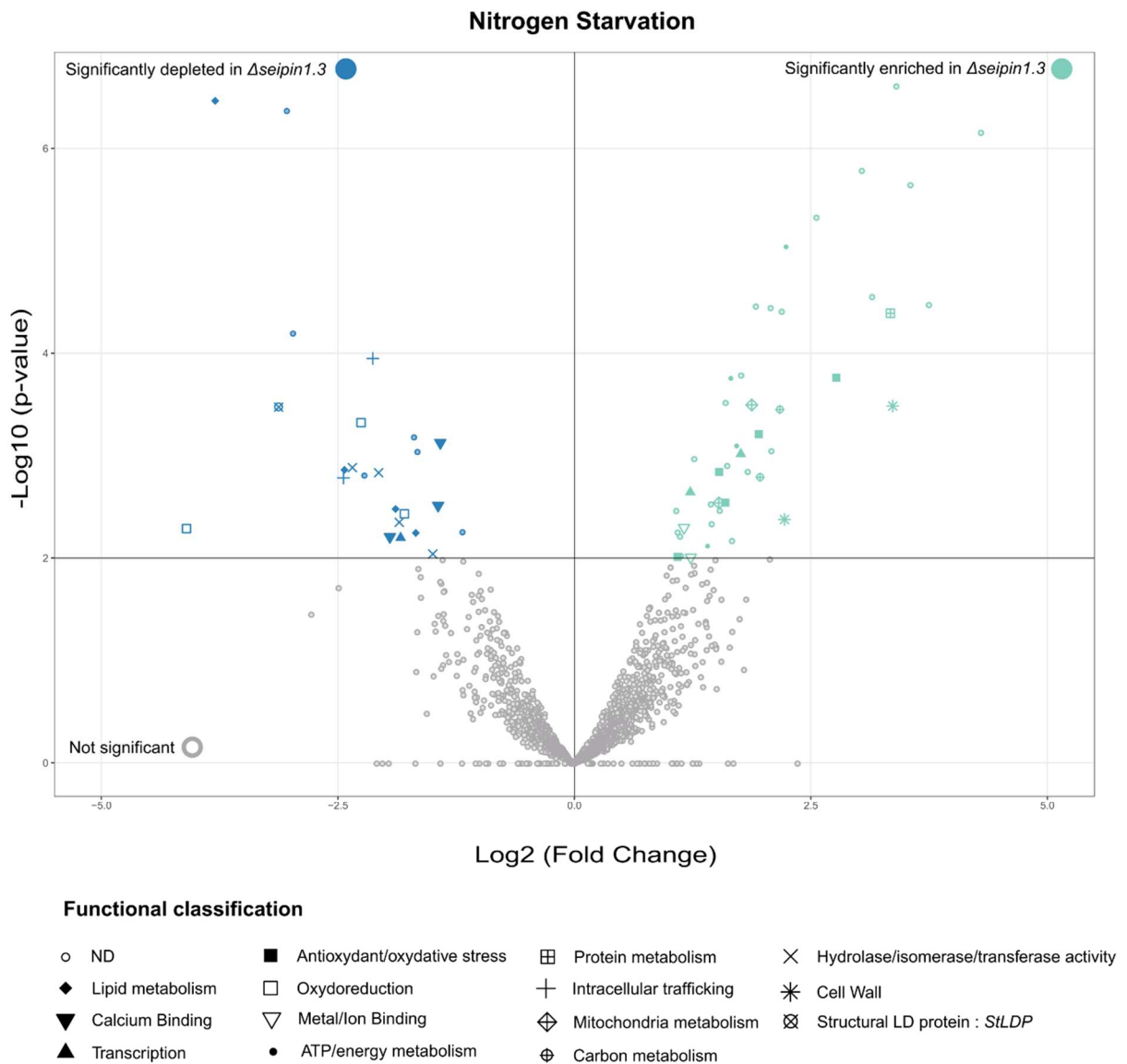
		Metallopeptidase activity/ hydrolase activity/catalytic activity	RPN11	Phatr3_J20227.p1	B7FYR8		
Intracellular trafficking	(membrane bound protein)	? Band7		Phatr3_J19805.p1	B7FXB1		
	(membrane bound protein)	? Band7		Phatr3_J11673.p1	B7FWC4		Yes
	transmembrane transport	Proton transporter activity		Phatr3_J44603.p1	B7FUM8	mitochondria	
		Protein transport		Phatr3_J27039.p1	B7FXR6	ER	
		Cytoskeletal protein binding	CacyBP	Phatr3_J43058.p1	B7FQH4		
	intracellular protein transport	Golgi to vacuole transport	AP3sigma	Phatr3_J14536.p1	B7G598	Cytoplasmic vesicle membrane	
Photosynthesis	photosynthesis, light harvesting	Protein fucoxanthin chlorophyll a/c protein / chlorophyll binding	LHCF8	Phatr3_J22395.p1	B7G6Y1	Plastid	Yes
	Photosynthesis		YCF3	gi 118411013 ref YP_874408.1	A0T0D3 · YCF3	plastid thylakoid	
	Photosynthesis	Chlorophyll binding	Lhcf6	Phatr3_J29266.p1	B7G5S7	plastid	
protein metabolism	Protein maturation	signal peptide processing		Phatr3_J18533.p1	B5Y4T0	ER membrane	
	asparagine biosynthetic process	Ligase activity/ aspartate-ammonia ligase activity		Phatr3_J44902.p1	B7FW24	cytoplasm	
<b>LD protein significantly depleted in <i>Aseipin1.3</i> in high light condition</b>							
Translation	Translation	Structural molecule activity/ribosome		Phatr3_J23748.p1	B7GCW6	chloroplast	
	Translation	Structural molecule activity/ribosome		Phatr3_J9199.p1	B7FNY4		Yes
	Translation	Structural molecule activity/ribosome	rpl31	gi 118411083 ref YP_874478.1	A0T0K3 · RK31	plastid	
	Translation	Structural molecule activity/ribosome	rpl27	gi 118411044 ref YP_874439.1	A0T0G4 · RK27	plastid	
	Translation	Structural molecule activity/ribosome		Phatr3_J6847.p1	B7FXJ2		Yes
	Translation	Structural molecule activity/ribosome	rps16	gi 118411051 ref YP_874446.1	Q5D704 · RR16	Plastid	
	Translation	Structural molecule activity/ribosome		Phatr3_J18559.p1	B5Y4X4		Yes
	Translation	Structural molecule activity/ribosome		Phatr3_J23691.p1	B7GCP9		
	Translation	Structural molecule activity/ribosome		Phatr3_EG02477.p1	B7FP80		Yes
Photosynthesis	Photosynthesis	oxidoreductase activity/ PhotosystemII	psbV	gi 118411006 ref YP_874401.1	A0T0C6 · CY550	plastid	Yes
	antioxidativ defense system		GLRX1	Phatr3_J16854.p1	B7GDY5		
	Photosynthesis	Light Harvesting complex	FCPF	Phatr3_J51230.p1	Q41094 · FCPF	Plastid	Yes
Hydrolase/isomerase/transferase activity		Hydrolase activity/protein folding chaperone/ATP-dependant	HSP90	Phatr3_J55215.p1	B7GEF7	mitochondria	

	Amino acid metabolic process	Transferase activity/glycine hydroxymethyltransferase	SHMT2	Phatr3_J54015.p1	B7FQ66	mitochondria	
	carbohydrate metabolic process	Isomerase activity	PGAM_6	Phatr3_J33839.p1	B7FU06		
	Sulfur component metabolic process	Transferase activity/ hydroxymethylbilane synthase activity	hemC	Phatr3_J51811.p1	B7FWY2		
		Transferase activity/Metal Ion binding		Phatr3_draftJ913.p1	B7S466		
Lipid metabolism		Lipid Binding/ Fatty acyl COA binding		Phatr3_J48778.p1	B7G8C2		Yes
	transmembrane transport	transporter/ligase activity	atpB	Phatr3_J54086.p1	B7FS46	thylakoid	Yes
Intracellular trafficking	protein Transport	multivesicular body sorting pathway		Phatr3_J38893.p1	B7G749	ESCRTIII complex	
	transmembrane transport	Transporter/ligase/atp-dependant activity		Phatr3_J27923.p1	B7G162		Yes
		protein targetting ?		Phatr3_J50437.p1	B7GE44		
Structural LD protein	Transmembrane protein : StLDP	LD coating protein	StLDP	Phatr3_J48859.p1	B7G8M1	Lipid Droplet	Yes
<b>LD protein significantly enriched in <i>Dseipin1.3</i> in nitrogen starvation condition</b>							
		Heat Shock protein ?	HSP20	Phatr3_J54656.p1	B5Y3Y4	signal peptide	
	Cell protection	Antioxydant ?		Phatr3_J49335.p1	B7GA91		
Antioxydant/oxydative stress	response to stress	Hydrolase activity/catalytic activity on a protein		Phatr3_J49059.p1	B7G9D0	signal peptide	
	redox/stress response	antioxydant ?		Phatr3_J14096.p1	B7G3E3		
	Reponse to oxydative stress ?	Hydrolase activity		Phatr3_J9211.p1	B7FQY2		
	ATP metabolism	Isomerase/phosphotransferase activity		Phatr3_J50140.p1	B7GD33	cytoplasm	
ATP/energy metabolism	'de novo' IMP biosynthetic process	ATP binding		Phatr3_J18080.p1	B7FS23		
	cell signalling ??	ATP dependant kinase		Phatr3_J7164.p1	B7GA25		
	Mitochondrial ADP/ATP transporter	ATP/ADP antiporter activity		Phatr3_draftJ1579.p1	B7S3P4		
Carbon metabolism	Carbon metabolism	Hydrolase activity		Phatr3_EG02526.p1	B7G259	Signal peptide	
	Carbon metabolism	Lyase/isomerase activity		Phatr3_J18228.p1	B7FSQ0	signal peptide	
Metal/Ion Binding	Metal ion binding (Zinc)	Lyase activity		Phatr3_J54251.p1	B7FUE9	peptide signal	
	Metal ion binding (Zinc)			Phatr3_J43234.p1	B7FR29		
Transcription	Transcription	mRNA maturation ?		Phatr3_J21983.p1	B7G573		
	Transcription factor	DNA binding		Phatr3_J33765.p1	B7FTT3		
Protein metabolism	proteolyse	Hydrolase activity/catalytic activity		Phatr3_J46872.p1	B5Y419		
Mitochondria metabolism	Mitochondrial function ?	Kinase ?		Phatr3_J21207.p1	B7G1Y2	signal peptide	
	mitochondrie			Phatr3_J5175.p1	B5Y4P4	mitochondria	

membranes							
Cell Wall	Silica cell wall ?	Linked to diatom cell wall	fru2	Phatr3_J48054.p1	B7G5U3		
	Biominingalization/cell adhesion	Myrosinase-binding protein 2		Phatr3_J45068.p1	B7FWD0	peptide signal	Yes
transmembrane Transport	Transport	transmembrane transporter activity		Phatr3_J47769.p1	B7G4U4		
LD protein significantly depleted in <i>Aseipin1.3</i> in nitrogen starvation condition							
Calcium Binding	Calcium ion binding			Phatr3_J55097.p1	B7GBS5	peptide signal	
	Calcium ion binding			Phatr3_J44251.p1	B7FTG9	peptide signal	
	Calcium ion binding			Phatr3_J48607.p1	B7G7V1		
Lipid metabolism	membrane bound protein/binding to lipids ?			Phatr3_J11673.p1	B7FWC4	mitochondria	Yes
	membrane bound protein/binding to lipids ?			Phatr3_J19805.p1	B7FXB1	mitochondria	
	Lysophospholipids activity	Transferase activity		Phatr3_J45551.p1	B7FY25		
	response to stress?	Lipid oxydation		Phatr3_J46486.p1	B7G1E2	peptide signal	
Intracellular trafficking	transmembrane Transport	Transporter/hydrolase/ ATP dependant activity		Phatr3_J43299.p1	B7FRS8		
	transmembrane Transport	ATP binding/transporter/hydrolase activity		Phatr3_J55010.p1	B7G9R3		Yes
Oxydoreduction	reducing mercury	Oxidoreductase activity		Phatr3_EG02228.p1	B7GBE9		
	generation of precursor metabolites and energy	oxydoreductase activity/binding to heme and iron/ electron transfer activity	PetJ	Phatr3_J44056.p1	B5Y578	chloroplast thylakoid lumen	Yes
	NADP binding	oxydoreductase activity		Phatr3_J37667.p1	B7G3E9		Yes
Hydrolase/isomerase/transf erase activity	Carbon metabolism	isomerase/phosphotransferase activity		Phatr3_EG02240.p1	B7G8H5	peptide signal	
	nucleotides clivages	Hydrolase		Phatr3_J34522.p1	B7FV27		
	Amino Acid/carbon metabolism	Transferase activity	GFA1	Phatr3_J14994.p1	B7G6T5		
		Transferase activity		Phatr3_J22909.p1	B7G959	peptide signal, chloroplastic	
	nucleotides clivages	Hydrolase		Phatr3_J34522.p1	B7FV27		
Transcription	Transcription	DNA binding ?		Phatr3_J50546.p1	B7GEG1	peptide signal	
Strcutural LD protein	Transmembrane protein : StLDP	LD coating protein	StLDP	Phatr3_J48859.p1	B7G8M1	Lipid Droplet	Yes

### 4.3.3 Comparaison des profils protéomiques de LD entre lignée sauvage et mutant *Seipin* en condition de carence en azote

On constate dans un premier temps que des protéines impliquées d'une part, à différents niveaux du métabolisme primaire sont présentes dans nos résultats mais également dans de nombreuses autres fonctions cellulaires (**Figure 86**). Les LD sont, en effet, décrites de plus en plus fréquemment comme engagées dans de nombreux aspects du métabolisme et intervenant à plusieurs niveaux : en tant que plateformes de transfert, de stockage ou bien même de réaction, ce qui est soutenu ici par le large éventail de fonctions représentées.



**Figure 86 : Volcano plot montrant les fonctions protéiques enrichies ou diminuées chez le mutant *Δseipin1.3* par rapport à la lignée sauvage en condition de carence en azote.** Les protéines dont l'abondance est significativement différente entre les deux conditions ont été classées sur la base de leurs fonctions répertoriées par Uniprot en 14 catégories. Les protéines inconnues ou sans fonction prédite ont été assignées à une classe non déterminée (ND).

Dans les LD isolées chez le mutant *Δseipin1.3*, on constate de manière assez nette un enrichissement de protéines aux propriétés antioxydantes ou associées à des mécanismes cellulaires de protection contre du stress oxydatif. Plusieurs protéines associées au métabolisme primaire sont également enrichies.

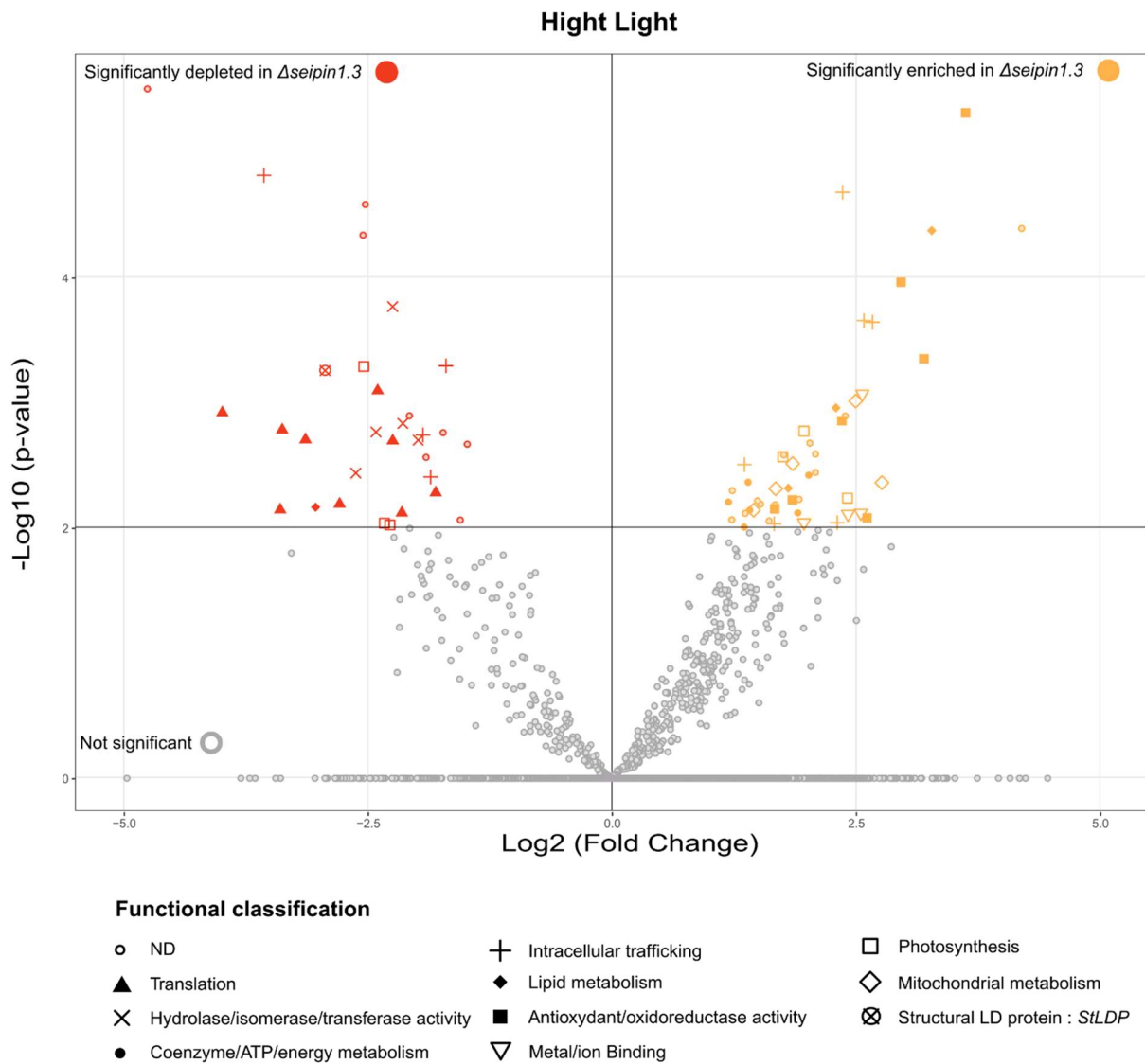
Les enzymes impliquées dans des réactions enzymatiques de type hydrolase, isomérase, transférase, impliquées en particulier dans la synthèse des acides aminés et dans le clivage des nucléotides, se trouvent significativement diminuées. On retrouve également plusieurs protéines reliées au métabolisme des lipides, dont certaines sont normalement localisées dans les membranes mitochondriales.

De manière très intéressante, on relève l'enrichissement de protéines liant des métaux ou bien des ions, en l'occurrence du Zinc pour les deux protéines identifiées (**Tableau 4**) ; inversement, trois protéines liant des ions Calcium voient leur abondance diminuée. Dans des tissus humains, il a été montré que la Seipin pouvait être associée avec des sites de contacts ER-mitochondries dont le nombre est stimulé par des périodes de jeûnes et réduit en condition riches de nutriments (Combot *et al.*, 2022). Dans les KO Seipin (lignées adipocytaires 3T3-L1 humaines), l'import de Calcium à la mitochondrie est affecté et le cycle de Krebs ainsi que les niveaux d'ATP y sont réduits. Des protéines dont les localisations sont prédites vers divers organites comme le RE ou les mitochondries sont fréquemment retrouvées dans les protéomes de LD et soulignent la particularité des LD à établir des sites de contacts très variés (Dhiman *et al.*, 2020). Nos résultats soulèvent ainsi des questions sur l'implication potentielle de *PtSeipin* dans l'établissement de tels sites de contacts LD-mitochondrie. Il est possible que de tels sites de contacts soient également présents chez *Phaeodactylum tricornutum* et que ces sites soient affectés chez les mutants. On peut alors supposer que des protéines prédites comme mitochondriales puissent être soit des contaminants, soit réellement liées à des contacts LD-mitochondries (abondance positive par exemple B5Y4P4, **Tableau 4**).

Enfin, on peut relever des variations dans l'abondance de quelques protéines reliées à des fonctions de transport transmembranaire et de trafic intracellulaire appuyant la connectivité des LD au reste de la cellule.

#### 4.3.4 Comparaison des profils protéomiques de LD entre lignée sauvage et mutant Seipin en condition de forte lumière

Nous avons également classé et assigné les protéines significatives dont l'abondance change chez le mutant sous stress lumineux selon leur classification fonctionnelle (**Figure 87**). Un tableau comparatif du nombre de protéines concernées est également proposé et permet de comparer celles dont l'abondance varie dans le même sens dans les deux conditions de cultures (**Tableau 5**)



**Figure 87 : Volcano plot montrant les fonctions protéiques enrichies ou diminuées chez le mutant *Δseipin1.3* en condition de forte lumière.** Les protéines dont l'abondance est significativement différente entre les deux conditions ont été classées sur la base de leurs fonctions répertoriées par Uniprot en 10 catégories. Les protéines inconnues ou sans fonction prédites ont été assignées sous une classe non déterminée (ND).

**Tableau 5 : Tableau récapitulatif du nombre de protéines associées à différentes fonctions dans les LD purifiées.** Le nombre de protéines significativement enrichies ou diminuées sont montrées.

Functional classification	Enriched in $\Delta Seipin1.3$ LD		Depleted in $\Delta Seipin1.3$ LD	
	N starvation	High Light	N starvation	High Light
Antioxydant/oxydative stress	5	7		
ATP/energy metabolism	4	6		
Protein metabolism	1	2		
Mitochondria metabolism	2	5		
Metal/Ion Binding	2	4		
Carbon metabolism	2			
transmembrane Transport	1			
Cell Wall	2			
Transcription	2		1	
Lipid metabolism		3	4	1
Intracellular trafficking		6	2	4
Photosynthesis		3		3
Oxydoreduction			3	
Calcium binding			3	
Translation (Ribosomal proteins)				9
Hydrolase/isomerase/transferase activity			5	5
Structural LD protein (StLDP)			1	1

On constate qu'il existe plusieurs familles fonctionnelles en commun avec celles identifiées en carence en azote (**Tableau 5**).

Parmi celles qui sont enrichies chez le mutant dans les deux conditions de stress, on relève un nombre important de protéines associées au stress oxydatif, au métabolisme énergétique primaire, au métabolisme des protéines ainsi que de la mitochondrie. Inversement, de nombreuses enzymes de type hydrolase, isomerase, transferase sont diminuées, ainsi que la protéine StLDP.

Parmi les protéines significativement enrichies chez  $\Delta seipin1.3$ , un certain nombre sont associées à la réponse au stress oxydatif. La production de molécules réactives de l'oxygène (ROS) est courante lorsque les cellules font face à différents stress (disponibilité du CO<sub>2</sub>, exposition aux UV, carence nutritionnelle, infections virales, etc., Rosenwasser *et al.*, 2014). En carence en azote, des enzymes sensibles aux ROS peuvent activer et réguler différentes voies métaboliques (photosynthèse, photorespiration, synthèse de lipides, métabolisme de l'azote) faisant intervenir conjointement le plaste et la mitochondrie (Rosenwasser *et al.*, 2014). En condition de forte lumière, les ROS s'accumulent presque uniquement dans le plaste (Asada, 2006; Waring *et al.*, 2010) et les cellules qui en accumulent des quantités élevées sont vouées à une mort cellulaire (Mizrachi *et al.*, 2019). Le

mutant *Δseipin1.3* étant plus sensible au stress lumineuse, on peut supposer que des fonctions de régulations supplémentaires soient enclenchées permettant de limiter les dommages causés à la cellule et aux photosystèmes. On retrouve ainsi de nombreuses protéines reliées à la photosynthèse, pour certaines diminuées, d'autres enrichies. Par exemple, deux protéines « Light Harvesting Complex » sont détectées, une est enrichie (LHCF8, Uniprot B7G6Y1) chez *Δseipin1.3* et l'autre est diminuée (FCPF, Uniprot : Q41094). Ces deux protéines étaient, par ailleurs, présentes dans le protéome de LD chez (Lupette *et al.*, 2019) en carence en azote.

Les variations en azote et en intensité lumineuse stimulent des mécanismes de dialogue entre chloroplaste et mitochondrie *via* des enzymes sensibles au potentiel redox de la cellule (Rosenwasser, Graff van Creveld, *et al.*, 2014). Ici, l'abondance et la forte représentativité des protéines liée au stress oxydatif chez les mutants, permet de supposer que ces mécanismes de dialogues inter organites ont été déstabilisés et que la LD y joue probablement un rôle important. En ce sens, on retrouve de nouveau en stress lumineuse plusieurs protéines associées au métabolisme mitochondrial qui sont enrichies.

Ensembles, ces données suggèrent que la LD chez *P.tricornutum* communique activement avec les organites comme le plaste et la mitochondrie, et participe probablement à de nombreux processus métaboliques permettant de maintenir une homéostasie cellulaire. Dans le cas de lignées mutantes pour la Seipin, un très grand nombre de ces processus semblent très déstabilisés, permettant encore de questionner la relation entre Seipin, plaste, mitochondrie et LD chez *P.tricornutum*.

Le nombre de protéines reliées au trafic intracellulaire est plus important qu'en condition de carence en azote, notamment des transporteurs membranaires ainsi que certaines protéines impliquées dans les transports vésiculaires entre organites.

De manière extrêmement nette et frappante, on constate qu'un nombre très important de protéines ribosomales associées à la traduction sont toutes diminuées dans la condition de stress lumineuse chez *Δseipin1.3*. La présence de protéines ribosomales est fréquemment rapportée dans les protéomes de LD, notamment en condition de carence en azote chez des microalgues : on en détecte 54 chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Moellering and Benning, 2010), 8 chez *P.tricornutum* (Lupette *et al.*, 2019). En condition de carence en azote et lorsque les cellules ne sont plus capables de se diviser, leur stockage à la LD pourrait permettre de les protéger en vue de la reprise active de la traduction lorsque les conditions redeviennent favorables. Ici, en condition de plus forte lumière, le fait qu'elles soient fortement diminuées chez *Δseipin1.3* suggère l'implication potentielle de la Seipin - et de son absence - dans leur recrutement à la LD dans cette condition. En effet, il est surprenant qu'aucune



d'entre elles ne soit ressortie également diminuée chez le mutant dans la condition de carence en azote.

Enfin, plusieurs protéines associées au métabolisme des lipides sont présentes. Trois d'entre elles sont significativement enrichies chez *Δseipin1.3* et sont prédites en tant que diacylglycerol kinase (Uniprot B7FVQ2), phospholipide scramblase (Uniprot B7GC30) et farnesyl diphosphate synthase (Uniprot B7GA81). Au contraire, une protéine possédant un site de liaison à l'Acyl-CoA est significativement diminuée (Uniprot B7G8C2). Cette protéine a également été identifiée comme une protéine majeure dans les protéomes de LD précédemment établis chez *P.tricornutum* (Yoneda *et al.*, 2016; Lupette *et al.*, 2019) ; elle possède une fonction prédite de liaison à l'acyl-CoA et était suggérée comme impliquée dans la distribution ou la dégradation des TAG à la LD (Yoneda *et al.*, 2016).

#### 4.4 Conclusion sur les études de protéomiques

Les résultats de protéomiques comparatives de LD entre lignée mutante Seipin et lignée sauvage présentées ici mettent en évidence des différences importantes à plusieurs niveaux.

Tout d'abord, les variations dans l'abondance de protéines entre conditions de culture permettent de mettre en avant le caractère unique des LD produites. Dans la majorité des espèces/organes/tissus, les LD sont désormais perçues et décrites comme des organites à part entière, très importants pour l'homéostasie cellulaire et dont la composition lipidique ou protéique fluctue au fil des conditions et des stress biotiques ou abiotiques rencontrés (Le Moigne, Guéguen and Salvaing, 2021). Ces données sont, à notre connaissance, les premières à mettre en évidence une telle diversité dans le cortège protéique associé aux LD chez *P.tricornutum* entre deux conditions de culture différentes.

Ensuite, la comparaison des protéomes entre le mutant *Δseipin1.3* et la souche sauvage révèlent notamment la perte de la protéine StLDP, protéine majoritaire des LD de *Phaeodactylum* (Yoneda *et al.*, 2016) et qui se localise à la surface des LD mais également à la membrane externe du plaste (Yoneda *et al.*, 2023). Les études fonctionnelles de StLDP par génération de lignées KO montrent un phénotype extrêmement proche de ce qu'on observe chez les mutants Seipin en ce qui concerne le nombre et la taille des LD, la morphologie des cellules et l'accumulation de TAGs intracellulaires (Taparia *et al.*, 2021a; Yoneda *et al.*, 2023). Ensemble, nos résultats apportent des éléments de compréhension nouveaux dans la formation de la LD chez *Phaeodactylum* et suggèrent pour la première fois que Seipin et StLDP sont dépendants l'un de l'autre dans la biogénèse de la LD. Notre hypothèse est que la Seipin recrute activement StLDP à la surface de la LD, selon un mécanisme moléculaire non déterminé. L'interaction directe entre la Seipin et des protéines majoritaires des LD a été décrite dans de nombreux autres organismes et est cohérente avec cette hypothèse ; StLDP pourrait être un homologue fonctionnel de LDAF1 chez les mammifères (Chung *et al.*, 2019), Ldo45

chez la levure (Eisenberg-Bord *et al.*, 2018), et LDIP chez *Arabidopsis thaliana* (Pyc *et al.*, 2021) (voir Introduction, partie 3). L'interaction entre Seipin et StLDP doit désormais être confirmée afin d'établir un modèle moléculaire, ce qui permettra de progresser davantage dans la compréhension fine du mécanisme de formation des LD chez *P.tricornutum*.

Enfin, le constat que des protéines associées à des fonctions métaboliques différentes sont positivement ou négativement affectées chez les mutants souligne davantage qu'un désordre métabolique profond, n'affectant pas uniquement la biosynthèse des lipides, est provoqué par la perte de la Seipin. Dans les protéomes de LD publiés chez *P.tricornutum*, on trouve des protéines avec des fonctions diverses surprenantes (transcription/traduction, stockage des histones, liaison au système vésiculaire et au cytosquelette). Dans les LD du mutant  $\Delta seipin1.3$ , on constate une diminution de protéines impliquées dans la liaison au calcium, la diminution de protéines ribosomiques, de protéines impliquées dans le métabolisme de la mitochondrie et de protéines impliquées dans le trafic intracellulaire. Cela nous permet de supposer que l'implication de la Seipin ne se limite pas uniquement à la biogenèse en tant que telle des LD et à leur structuration, et qu'elle pourrait notamment intervenir dans l'établissement de connections avec d'autres organites, faisant de la LD une structure profondément reliée à de nombreux aspects du métabolisme.

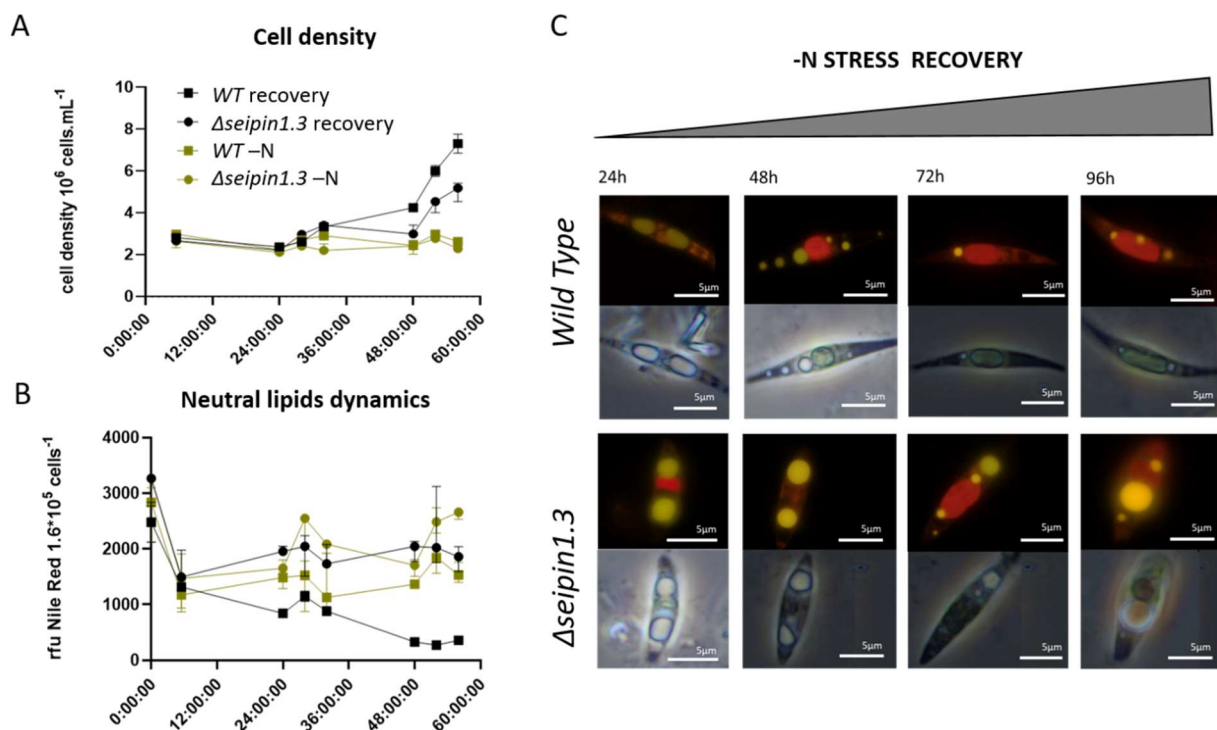
## 5 Remobilisation des LD en sortie de carence nutritionnelle

Nous avons ainsi montré que les LD produites chez les mutants Seipin étaient dépourvues de leur protéine majoritaire, StLDP. Dans la littérature, les mutants KO pour StLDP présentent un phénotype similaire au mutant Seipin, ainsi que des troubles à remobiliser leurs lipides accumulés dans les LD après une carence nutritionnelle (Taparia *et al.*, 2021a). Deux mécanismes distincts permettent de dégrader les LD : l'hydrolyse par des lipases et la lipophagie. Dans les KO StLDP, les auteurs ont suspecté que le ratio surface/volume plus faible dans des LD de taille importante restreint l'accès à des lipases et que l'hydrolyse des TAG soit affectée (Taparia *et al.*, 2021a). Chez des levures mutantes Seipin, la localisation de la lipase Tgl3 à la surface de la LD est, par exemple, perturbée (Wolinski *et al.*, 2015) et dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*, la remobilisation des lipides depuis des LD de tailles importante pendant la germination est également affectée (Taurino *et al.*, 2018).

Nous avons ainsi cherché à évaluer dans quelle mesure les mutants Seipin étaient capables de remobiliser leurs LD en sortie de carence nutritionnelle. Nous avons choisi d'induire l'accumulation par une carence en azote qui permet d'obtenir des LD de tailles comparables entre la lignée  $\Delta seipin1.3$  et la lignée sauvage. La condition de forte lumière provoquant l'apparition de plusieurs petites gouttelettes chez le sauvage et d'une très volumineuse chez  $\Delta seipin1.3$ , n'a pas été retenue.

### 5.1 Les mutants *Seipin* présentent des troubles dans la remobilisation des TAG en sortie de carence nutritionnelle

Après 7 jours de carence d'azote, les cultures WT et  $\Delta seipin1.3$  présentaient une division cellulaire à l'arrêt couplée à une accumulation élevée de lipides (non présentés). Nous avons ensuite réalisé une expérience au cours de laquelle la moitié des cultures a été maintenue en carence d'azote avec un renouvellement du milieu (ESAW 00N 10P), tandis que l'autre moitié a été replacée dans un milieu riche en azote (ESAW 10N 10P). Les cultures ainsi séparées ont été suivies pendant 60 heures en mesurant la croissance cellulaire et la fluorescence du rouge de Nil ; des images en microscopie à épifluorescence ont été acquises toutes les 24 heures pendant 96 heures pour observer la morphologie des LD.



**Figure 88** : Les mutants *Seipin* ne parviennent pas à remobiliser efficacement les LD dans les jours qui suivent la sortie de la carence nutritionnelle. (A) : Estimation de la reprise de croissance des lignées après 7 jours de carence en azote. La mesure de la croissance est basée sur la lecture de la DO à 730nm et calculée comme présentée dans le matériel et méthodes. Respectivement en noir et en vert, cellules en sortie de carence (recovery) ou cellules en carence prolongée (-N). (B) : Mesure de la quantité de lipides neutres après marquage au rouge de Nil. Respectivement en noir et en vert, cellules en sortie de carence (recovery) ou cellules en carence prolongée (-N). (C) : Observations au microscope à épifluorescence des cellules marquées au rouge de Nil dans les jours qui suivent la sortie de carence azote. En rouge autofluorescence du plaste, en jaune fluorescence des LD marquées au rouge de Nil. Barre d'échelle : 5 $\mu$ m.

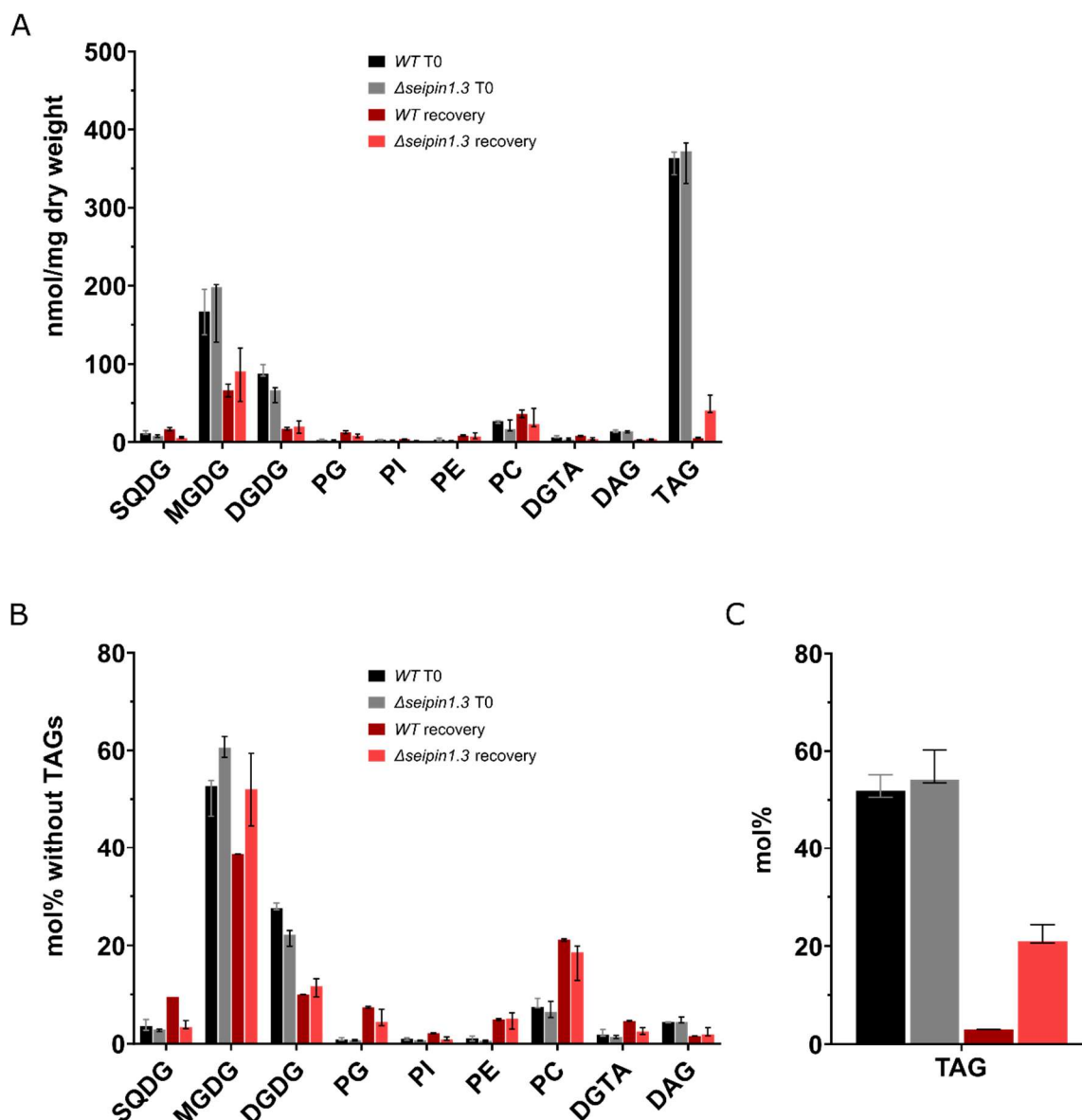
La **Figure 88** montre que la lignée  $\Delta seipin1.3$  ne récupère pas comme le WT en sortie de carence nutritionnelle. On observe sur les courbes de croissance (**Figure 88A**) que plus de 48 heures sont nécessaires avant que la croissance ne reprenne alors que celle de la lignée sauvage reprend au bout

de 24 heures. On constate que la lignée *Δseipin1.3* présente une intensité de fluorescence du rouge de Nil très élevée qui se maintient dans le temps et reste comparable aux cellules maintenues en carence même plusieurs jours après sortie de carence. En revanche, la souche sauvage remobilise très rapidement les LD : l'intensité de fluorescence du rouge de Nil diminue rapidement jusqu'à des niveaux faibles à partir de 48 heures (**Figure 88B**) ; on constate en parallèle que la vitesse de croissance augmente de nouveau fortement (**Figure 88A**).

Les images de microscopie révèlent de manière intéressante que les LD volumineuses présentes dans les deux lignées en fin de carence semblent fragmentées en plusieurs petites LD chez le WT dès 48h tandis qu'elles restent intactes chez *Δseipin1.3*. Au bout de trois jours de récupération, on relève toujours la présence d'au moins une LD très volumineuse chez *Δseipin1.3*. L'apparition de plusieurs nouvelles petites LD (avec une forte proximité au plaste) suggèrent qu'elles proviennent soit de la fragmentation d'une partie de la LD principale, soit qu'elles ont été néo-synthétisées. Leur proximité avec le plaste pourrait suggérer une néo-synthèse.

#### 5.1.1 Analyses lipidiques des lignées en sortie de carence

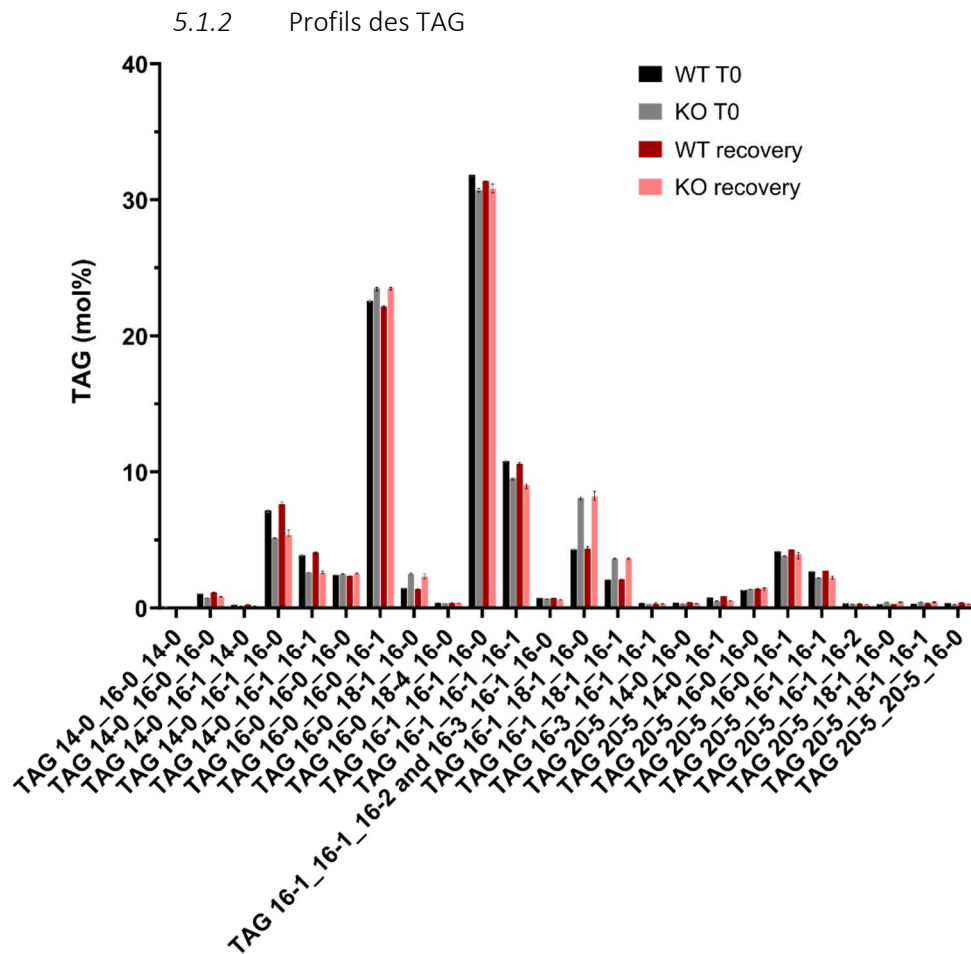
Des échantillons ont été prélevés en début et fin de cinétique de récupération afin d'estimer la composition lipidique des lignées en sortie de carence. Le point final de la carence nutritionnelle a été retenu (7 jours de carence N, T0) ainsi que les points finaux, soit après 4 jours de récupération dans du milieu complet (recovery), soit en carence prolongée (-N).



**Figure 89 : Analyses des classes lipidiques en sortie de carence nutritionnelle chez la lignée sauvage et  $\Delta seipin1.3$ .** (A) : quantités de chaque glycérolipides par masse sèche récoltée. (B) : les différentes classes de glycérolipides sont représentées en mol% en fonction du total, TAG exclus. (C) : profils uniquement des TAGs en mol% par rapport au total des glycérolipides. Bar : médiane, barres d'erreurs : min. et, max. n=3.

On constate **Figure 89** une forte accumulation de TAG après 7 jours de culture en carence en azote comme en adéquation avec ce qui est décrit au bout de 5 jours. La quantité de TAG accumulée est identique entre le mutant  $\Delta seipin1.3$  et la lignée sauvage et représente environ 50% des glycérolipides totaux. On observe qu'après 4 jours de sortie de carence, les niveaux de TAG dans la lignée sauvage sont revenus à des proportions comparables avec des valeurs de références lorsque les cellules sont cultivées dans du milieu complet (environ 3% des glycérolipides totaux) (Abida *et al.*, 2015). En revanche, la lignée  $\Delta seipin1.3$  maintient toujours une quantité et une proportion plus importante de TAG, de l'ordre de 20% des glycérolipides totaux et 9 fois en quantité comparé à la

lignée sauvage. Les phospholipides sont impactés de la même manière dans les deux lignées et se retrouvent diminués en carence comme précédemment rapportés (Abida *et al.*, 2015). Ils semblent restaurés de manière similaire dans les deux lignées en sortie de carence.



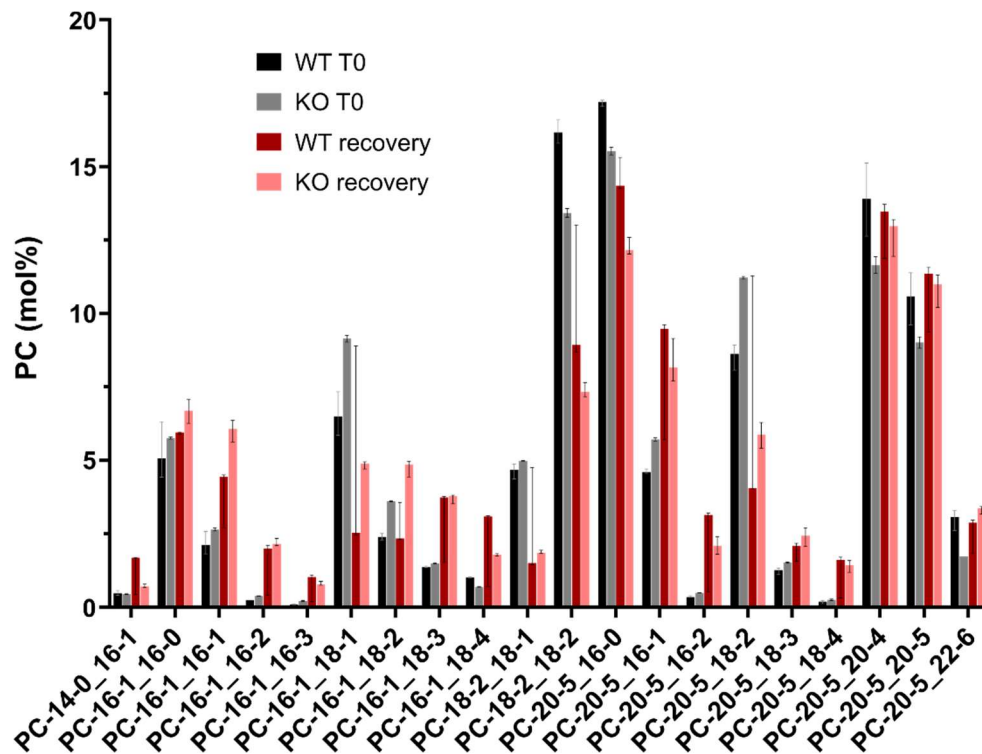
**Figure 90 : Profils des espèces composant les TAG dans les lignées en sortie de carence nutritionnelle.** Les espèces sont représentées en % du total de TAG. Bar : médiane, barres d'erreurs : min., max. n=3.

Les profils des espèces composant les TAG révèlent que la composition ne varie quasiment pas lorsque les cellules sortent d'une phase de carence, suggérant que toutes les espèces sont remobilisées de la même manière sans que certaines ne soient privilégiées. Néanmoins, ces analyses ont été réalisées après plusieurs jours de récupération, une cinétique avec des points de prélèvements plus rapprochés de la sortie de carence permettrait peut-être de mettre en évidence des différences entre certaines espèces.

On constate tout de même des différences de compositions entre la lignée sauvage et *Δseipin1.3* avec un enrichissement des trois espèces possédant un acide gras en 18:1 (TAG 16:0\_18:1\_16:0, TAG 16:1\_18:1\_16:0 et TAG 16:1\_18:1\_16:0) ainsi qu'un des TAG majoritaires, 16:0\_16:0\_16:1. En

contrepartie, on constate une diminution dans les espèces de TAG possédant un acide gras en 14:0 (14:0\_16:1\_16:0, TAG 14:0\_16:1\_16:1) ainsi que légèrement dans le TAG triple 16:1.

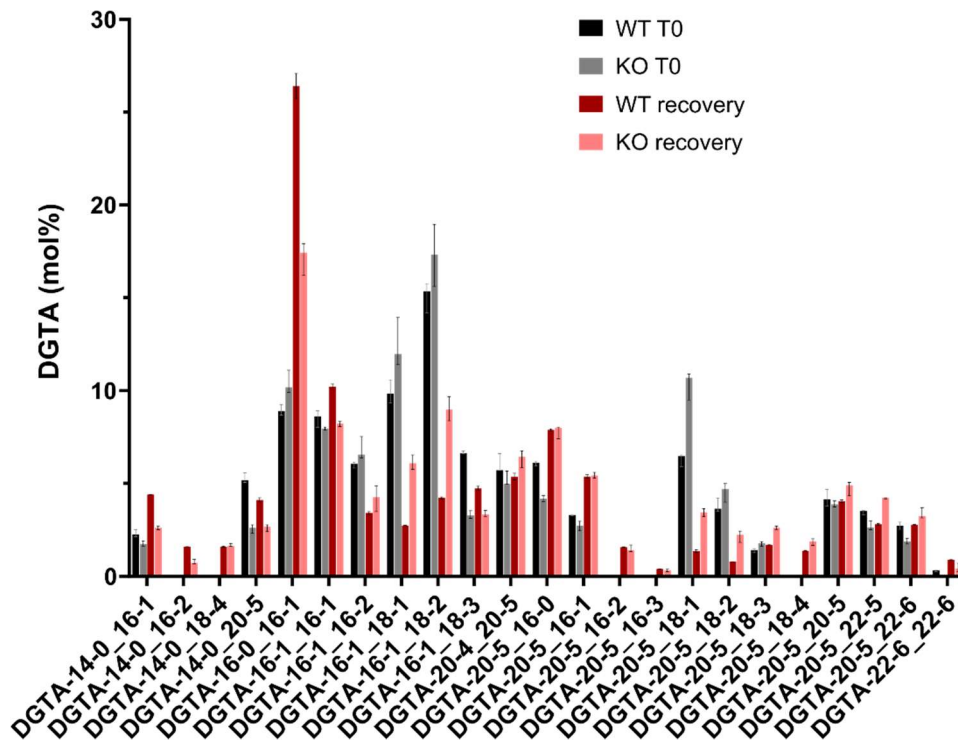
### 5.1.3 Exemple d'un profil de phospholipide, la PC



**Figure 91 : Profils des espèces composant la PC dans les lignées en sortie de carence nutritionnelle ou bien en carence prolongée.** Les espèces sont représentées en % du total de PC. Bar : médiane, barres d'erreurs : min., max.

Les profils d'acides gras des phospholipides que nous avons identifiés comme signature de la mutation *Seipin* sont également retrouvés en condition de carence en azote, avec notamment une diminution chez  $\Delta seipin1.3$  des PC 18:2\_18:2, PC 20:5\_20:4, PC 20:5\_20:5 et PC 20:5\_22:6 et une augmentation des espèces contenant des doubles C16 et des combinaisons de C16 et C18. De manière intéressante, la phase de récupération ne semble pas modifier ces ratios entre le sauvage et  $\Delta seipin1.3$  exceptés pour les PC contenant du 20:5.

#### 5.1.4 Profil du betaïne lipide DGTA



**Figure 92 : Profils des espèces composant le DGTA dans les lignées en sortie de carence nutritionnelle ou bien en carence prolongée.** Les espèces sont représentées en % du total de DGTA. Bar : médiane, barres d'erreurs : min., max. n=3.

De manière similaire à la PC, les espèces « signature » du DGTA qui avait été identifiées chez *Δseipin1.3* sont également retrouvées en carence en azote. On relève notamment une augmentation globale des espèces de DGTA 16:X\_16:X, et DGTA 16:X\_18:X (excepté 16:1\_18:3) ainsi que DGTA 20:5\_18:1. Certaines espèces ne sont pas du tout détectées après 7 jours de carence, notamment les DGTA 20:5\_16:2 et 16:3 ainsi que DGTA 14:0\_16:2 mais sont détectées après une phase de carence prolongée. Enfin, quelques espèces ne sont détectées ni chez le sauvage ni chez *Δseipin1.3* après 7 jours de carence mais sont détectées durant la phase de récupération: DGTA 14:0\_16:2, DGTA 20:5\_16:2 et 20\_5:16:3. Ces espèces étaient, par ailleurs, fortement diminuées ou non détectées chez les mutants Seipin dans les résultats présentés Chapitre 2.

## 6 Discussion et conclusion du Chapitre 3

Dans ce dernier chapitre, nous avons caractérisé les différences de composition protéique et lipidique des LD produites sous deux différents stress (carence nutritionnelle en azote et forte lumière) chez les mutants KO Seipin de *P.tricornutum*. Nous avons également cherché à évaluer la capacité de remobilisation des lipides depuis les LD chez les lignées mutantes en sortie de carence.



### 6.1 Pureté des LD purifiées

Les LD peuvent s'associer à diverses membranes (ER durant la biogenèse ainsi que plaste chez *Phaeodactylum*, peroxisome, mitochondries, cytosquelette...), ce qui peut conduire à la présence de protéines « contaminantes » dans les fractions de LD purifiées. C'est pourquoi certaines d'entre elles peuvent avoir une significativité biologique et ne doivent pas être considérées comme des artefacts, même si elles ne sont pas prédites comme des protéines de LD au sens strict.

L'analyse des glycérolipides dans les fractions purifiées de LD a permis de montrer un très fort enrichissement de TAG (97% à 99%). Des quantités mineures de glycérolipides plastidiaux, principalement de MGDG, ont toutefois été détectées dans les échantillons purifiés en carence en azote. Le profil de MGDG ne nous permet pas d'écarter une contamination plastidiale malgré tout très mineure. En revanche, ces lipides ne sont pas détectés dans les échantillons purifiés en condition de forte lumière bien que le protocole de purification utilisé soit identique. Les immunodétections des fractions protéiques des LD par des anticorps ciblant le RE, la mitochondrie, le peroxisome, le système vésiculaire, l'enveloppe nucléaire confirment l'absence de contamination par ces compartiments. En revanche, un signal très faible pour des enzymes des photosystèmes peut de nouveau suggérer une contamination mineure par le plaste.

### 6.2 Connection des LD aux organites et au métabolisme

Nous avons analysé les protéines présentes dans les LD purifiées par spectrométrie de masse en tandem. Des approches de protéomiques comparatives ont été utilisées pour identifier les protéines dont l'abondance était significativement enrichie ou diminuée, en fonction des conditions. Nous avons ensuite essayé de classer ces protéines selon leur fonction, connue ou prédite, entre la souche sauvage et le mutant Seipin. Ces données nous ont permis de constater que de nombreuses fonctions essentielles du métabolisme sont affectées comme le métabolisme primaire (fonction mitochondriale, photosynthèse), le métabolisme des lipides et des protéines. Le succès écologique des diatomées repose sur une optimisation très fine des relations entre ses organites énergétiques, que sont la mitochondrie et le plaste au moyen d'une communication inter organites, dont les mécanismes moléculaires sont peu à peu mis à jour (Prihoda *et al.*, 2012). Ces communications sont, en partie, assurées par des échanges de molécules à travers des surfaces de contact. La perception d'un signal de stress (production d'espèces réactives de l'oxygène) par un organite, peut alors déclencher une communication avec d'autres structures et enclencher des mécanismes de réponses. Les résultats présentés suggèrent l'implication potentielle de la LD dans cette communication notamment, à travers ses interactions avec un organite en particulier, la mitochondrie.

Il a été récemment mis en évidence que la Seipin chez l'Homme se localisait dans certaines conditions à des sites de contacts entre ER et mitochondries (Combot *et al.*, 2022). Il a été montré que la Seipin interagit avec deux acteurs transportant du calcium (Ca<sup>2+</sup>) : SERCA assurant le transport entre le cytosol (Bi *et al.*, 2014) et le lumen du RE et IP3R assurant le transport entre le RE et la mitochondrie (Theurey and Rieusset, 2017). Dans les mutants KO Seipin de cellules humaines, l'import de calcium à la mitochondrie diminue, ce qui réduit l'efficacité du cycle de Krebs et la concentration d'ATP produite (Combot *et al.*, 2022). Un point crucial, souligné par les auteurs, est que la Seipin dans les cellules mammifères assure des fonctions différentes, selon l'état métabolique des cellules dont la gestion du flux de calcium à la mitochondrie en période de carence nutritionnelle. Ainsi dans nos données, on retrouve des protéines liant le calcium fortement déplétées dans les LD chez les mutants Seipin, mais également de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme mitochondrial.

Les résultats présentés dans nos travaux suggèrent que les LD chez *P.tricornutum* pourraient être également impliquées dans des processus majeurs du métabolisme des diatomées où les interactions entre plaste et mitochondries sont d'une importance cruciale (Prihoda *et al.*, 2012; Bailleul *et al.*, 2015; Uwizeye *et al.*, 2021), et que ces processus seraient perturbés chez les mutants Seipin. Ces résultats ouvrent la voie à l'investigation du rôle de la LD dans les interactions complexes entre LD/mitochondrie/plaste et celui de la Seipin dans ces mécanismes physiologiques.

### 6.3 La protéine StLDP majoritaire des LD est fortement diminuée chez les mutants Seipin

La protéine StLDP est identifiée comme la protéine majeure dans tous les protéomes de LD établis chez *P.tricornutum* en condition de carence en azote (Yoneda *et al.*, 2016; Lupette *et al.*, 2019; Leyland *et al.*, 2020). À notre connaissance, aucun protéome de LD n'a été établi chez *P.tricornutum* dans une autre condition de culture, et nos données suggèrent que StLDP est également présente sur des LD produites en condition de stress lumineux.

Des travaux portant sur la caractérisation fonctionnelle de lignées KO StLDP montrent un phénotype similaire à celui des mutants Seipin pour ce qui est de la taille de LD et de l'accumulation de lipides (Taparia *et al.*, 2021a). La localisation récente de StLDP à la fois à la surface de la LD, mais également sur la membrane la plus externe du plaste (Yoneda *et al.*, 2023), nous encouragent à supposer que StLDP est activement recrutée par la Seipin sur la LD. Des mécanismes similaires de recrutement de protéines couvrant les LD par l'intermédiaire de Seipin sont décrits chez l'Homme (entre Seipin et LDAF1, Chung *et al.*, 2019), ou bien chez les plantes (entre Seipin et LDAP/LDIP, Pyc *et al.*, 2017, 2021). Il apparaît désormais essentiel de confirmer notre hypothèse. Premièrement, la localisation de StLDP dans des lignées mutantes Seipin pourrait être réalisée afin de confirmer son absence de la LD

(constatée en protéomique) mais également pour vérifier sa présence à la surface du plaste ce qui suggérerait que la Seipin est essentielle pour recruter StLDP spécifiquement sur la LD. Des expérimentations de complémentation par fluorescence bimoléculaire (BiFC) pourraient également être envisagées, pour évaluer une interaction directe entre Seipin et StLDP. En effet, il est possible qu'une protéine intermédiaire non identifiée soit nécessaire dans ce mécanisme moléculaire, comme c'est le cas pour les protéines LDAP chez les *Arabidopsis*. LDIP est, en premier lieu, recrutée par Seipin, permettant d'augmenter localement l'hydrophobicité membranaire, puis recrute LDAP lorsque l'hydrophobicité est suffisante (Pyc *et al.*, 2021). La recherche éventuelle de partenaires supplémentaires pourrait être réalisée par co-immunoprécipitation de Seipin couplée à de la détection par spectrométrie de masse.

#### 6.4 Remobilisation de lipides en sortie de carence nutritionnelle

Les TAG présents dans les LD représentent une source d'énergie importante, ainsi qu'une source de précurseurs fondamentaux pour la synthèse de nouvelles molécules organiques. La dégradation des TAG est également un processus important dans la gestion du carbone au cours du rythme circadien dans les organismes photosynthétiques (Yoshitake, Ohta and Shimojima, 2019). Dans les plantes et plus particulièrement les graines, la germination requiert une dégradation rapide et massive des TAG depuis les LD qui sont très abondantes dans ces tissus. Chez *A.thaliana*, la lipase SDP1 est cruciale dans ce processus et permet de recruter la LD au peroxisome, assurant la  $\beta$ -oxydation des acides gras hydrolysés depuis les TAG (pour revues, Yoshitake, Ohta and Shimojima, 2019; Ischebeck *et al.*, 2020). Un deuxième mécanisme de dégradation peut avoir lieu dans les cellules eucaryotes, et est appelé autophagie ou lipophagie lorsqu'elle concerne les LD. Ce processus peut avoir lieu dans la vacuole des plantes, ou bien être assuré par des structures autophagiques que l'on observe autour des LD en microscopie électronique chez l'algue verte *Micrasterias denticulata* (Schwarz *et al.*, 2017). Les auteurs observent également des points de contact importants entre LD et mitochondries ou peroxisomes, dans des conditions de remobilisation de lipides. Les mécanismes précis d'induction de la lipophagie chez les algues et les plantes ne sont pas encore bien compris (Yoshitake, Ohta and Shimojima, 2019).

Dans ces travaux, nous avons cherché à évaluer quelle était la capacité des mutants Seipin à remobiliser les LD. Les lignées mutantes StLDP montrent une accumulation de TAG couplée à une LD de taille importante, ainsi qu'un délai dans la récupération des LD en sortie de carence nutritionnelle en azote (Taparia *et al.*, 2021a). L'abondance de la protéine StLDP étant fortement diminuée dans les LD des mutants Seipin, nous avons émis l'hypothèse que ces mutants montreraient les mêmes difficultés à remobiliser les TAGs, ce qui s'avère être le cas : après 48h dans un milieu complet, les lignées sauvages sont parvenues à remobiliser une partie importante de leurs TAGs, tandis que les

KO présentent encore des LD de taille importante couplée à une intensité de fluorescence du rouge de Nil élevée.

Plusieurs hypothèses ont été évoquées par (Taparia *et al.*, 2021b), et notamment que StLDP pourrait empêcher la fusion des LD et permettre de garder un contrôle sur leur taille. Il a été montré qu'en carence en azote, des populations de LD sont successivement produites dans la cellule (Jausaud *et al.*, 2020) et sans protéine structurante à leur surface, nous pouvons supposer une fusion de ces LD pour aboutir à la LD unique surdimensionnée. Cette dernière présente alors un ratio surface/volume plus faible comparé à plusieurs LD de tailles réduites, ce qui limiterait donc la surface totale accessible aux lipases et ralentirait de ce fait le processus d'hydrolyse des TAG. Les triples mutants Seipin chez *Arabidopsis thaliana* accumulent également des LD surdimensionnées dont la remobilisation est affectée pendant la germination. Après 3 jours de germination, les triples mutants présentent toujours une quantité de TAG significativement plus importante (Taurino *et al.*, 2018). De plus, on relèvera que la distribution des lipases autour des LD est affectée dans la levure *S.cerevisiae* chez les mutants Seipin (gene *fld1*) (Wolinski *et al.*, 2015). La lipase Tgl3-GFP est notamment observée et localisée en un point sur la LD chez les sauvages, puis répartie tout autour de la LD dans des conditions favorisant la lipolyse. En revanche, chez les mutants Seipin ce signal est observé autour des LD quelle que soit la condition ce qui suggère que la Seipin soit requise pour organiser la répartition des lipases sur la LD.

Dans une deuxième hypothèse, Taparia *et al.*, 2021 évoquent également le processus d'autophagie. Il a été montré que la protéine majoritaire des LD chez la microalgue *Nannochloropsis oceanica* interagissait avec ATG8, un marqueur de l'autophagie dans le catabolisme des LD (Zienkiewicz *et al.*, 2020). Un motif de liaison ATG8 a été détecté sur la StLDP, ce qui suggère que des mécanismes similaires pourraient entrer en jeu (Leyland, Boussiba and Khozin-Goldberg, 2020; Taparia *et al.*, 2021a).

Enfin, des études récentes ont porté sur la localisation et la caractérisation de la surexpression de la protéine CGI-58 chez *P.tricornutum* (Shu, Pan and Hu, 2023) et complètent des travaux, notamment réalisés au laboratoire (thèse Josselin Lupette, 2018). CGI-58 est un activateur des TAG lipases dont la localisation mitochondriale chez *P.tricornutum* est très différente de celle observée chez les animaux (CGI est localisée à la surface des LD et interagit, par ailleurs, avec la ou les perilipin) ou les plantes (peroxysome). Son étude fonctionnelle chez *P.tricornutum* montre une accumulation de TAG dans des lignées KO (Calleja, Leterrier and Marechal, 2015), mais également dans les lignées surexpresses (Shu, Pan and Hu, 2023), soulignant dans tous les cas que CGI-58 est un acteur essentiel de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Elle est, d'ailleurs, identifiée par des approches de bio-

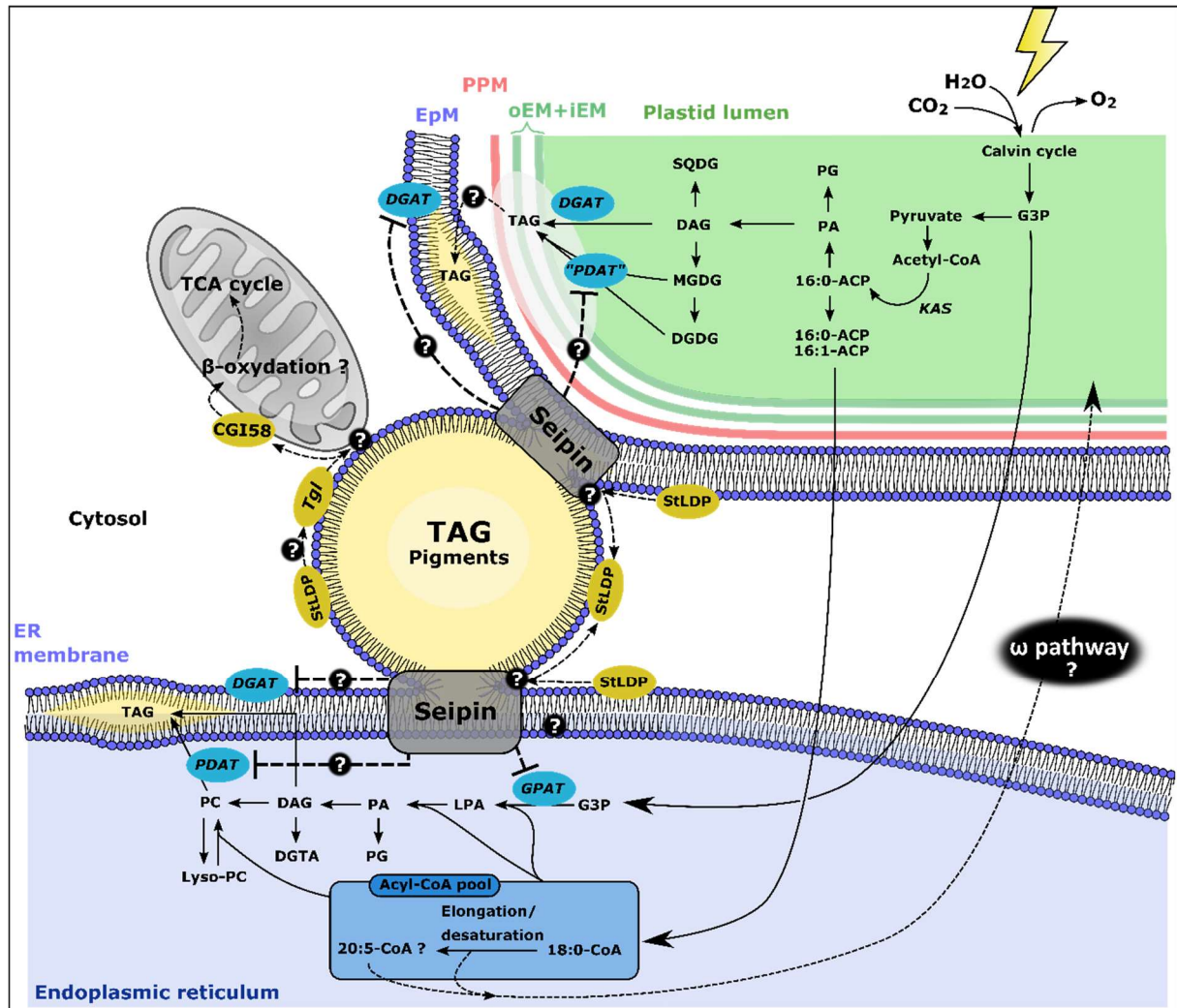
informatique parmi les candidats les plus significatifs ayant une fonction de TAG lipase chez *P.tricornutum* (Murison, Hérault, Schoefs, *et al.*, 2023). Comme nous l'avons constaté et évoqué précédemment, il semblerait que des interactions entre LD et mitochondrie soient déstabilisées chez les mutants Seipin chez *P.tricornutum* ; nous pouvons alors supposer que la dégradation des lipides *via* la  $\beta$ -oxydation à travers CGI58, ou bien d'autres acteurs moléculaires lipolytiques, soit perturbée.

Les données présentées et discutées dans ce chapitre soulèvent ainsi de nombreuses questions, notamment sur la relation entre LD et organites intracellulaires énergétiques (mitochondrie et plaste) chez *P.tricornutum*. Nous avons pu montrer que chez les mutants Seipin, l'équipement protéique était affecté, touchant une grande variété de fonctions métaboliques. Enfin, nous avons pu établir des hypothèses sur la remobilisation altérée des lipides chez *P.tricornutum*, et notamment sur cette caractéristique commune partagée avec les mutants StLDP décrits dans la littérature. Ces travaux nous permettent de présumer que StLDP soit un homologue fonctionnel putatif de LDAF (Homme) et LDIP (plantes, *A.thaliana*), ainsi que de la hisser comme candidat principal recruté par la Seipin, ce qui ouvre la voie à des travaux de caractérisation en ce sens.

**Proposition d'un modèle de fonctionnement de PtSeipin et  
discussion générale**



La **Figure 93** est proposée en support à la discussion présentée dans cette partie. Elle reprend les hypothèses d'interactions de la Seipin chez *Phaeodactylum tricornutum* dans l'anabolisme des glycérolipides, et notamment des TAG, et met également en perspective sa potentielle implication dans le catabolisme lipidique.



**Figure 93 : Modèle d'interaction de Seipin chez *Phaeodactylum tricornutum*.** La Seipin est représentée par un carré gris à la jonction entre la LD et la membrane du réticulum endoplasmique (RE, en bleu) ou la membrane du plaste (EpM, en bleu). La bicouche lipidique est représentée uniquement pour ces membranes et la LD est représentée bourgeonnant simultanément depuis la surface du plaste et du RE, bien que ce scénario n'ait pas été établi expérimentalement *in vivo*. Par souci de simplification, les trois autres membranes (PPM, oEM, iEM) enveloppant le plaste de *Phaeodactylum tricornutum* sont représentées par une simple ligne.

Les voies métaboliques impliquées dans la synthèse des lipides sont représentées dans les compartiments où elles se déroulent. La synthèse des acyl-ACP jusqu'à 16 carbones se déroule dans le plaste (compartiment en vert clair) et commence par la fixation du CO<sub>2</sub> atmosphérique à travers la photosynthèse et le cycle de Calvin. L'élongation des Acyl-CoA au-delà de 16 carbones et les désaturations sur des acides gras > 16 carbones ont lieu dans le RE (compartiment en bleu clair). Le retour des VLC-PUFA au plaste s'effectue par une voie non connue qualifiée de voie « oméga » représentée par des pointillés. Les enzymes impliquées dans la synthèse des TAG sont indiquées dans



un ovale bleu et leur relation hypothétique avec la Seipin est représentée par un trait en pointillés épais.

Les protéines potentiellement impliquées dans la dégradation des TAG *via* la lipolyse et la  $\beta$  oxydation sont représentées dans un ovale jaune. Leurs interactions hypothétiques sont représentées par une flèche en pointillés. La relation entre la mitochondrie et la LD est supposée par un point d'interrogation à l'interface entre les deux organelles.

EpM, Epi-plastidiale Membrane ; PPM, Membrane Peri-plastidiale ; oEM, Plastid outer Enveloppe Membrane ; iEM, Plastid inner Enveloppe Membrane ; StLDP, Stramenopile Lipid Droplet Protein ; Tgl, triglyceride lipase ; CGI58, Comparative Gene Identification 58 ; TCA cycle, cycle de Krebs ; G3P, glycérol-3-Phosphate ; LPA, acide lyso-phosphatidique ; PA, acide phosphatidique ; DAG, diacylglycérol ; TAG, triacylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; PG, phosphatidylglycérol ; PC, phosphatidylcholine ; Lyso-PC, Lyso-phosphatidylcholine ; DGTA, diacylglycéryl-3-O-2'-(hydroxyméthyl)-(N,N,N-triméthyl)- $\beta$ -alanine ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; GPAT, glycérol-sn-3-phosphate acyltransférase ; DGAT, diacylglycérol acyltransférase ; PDAT, phospholipid:diacylglycérol acyltransférase ; LPCAT, acyl-CoA :lysophosphatidylcholine acyltransférase.

## 1 Implication de la Seipin dans un modèle d'accumulation des TAGs chez les diatomées

L'architecture cellulaire des diatomées est particulière par la présence d'un plaste dont le stroma est enveloppé au total de quatre membranes. La membrane la plus externe est continue avec la membrane nucléaire. Cette caractéristique unique est le résultat des évènements d'endosymbioses auxquels ces organismes ont fait face (voir Introduction). L'étude du métabolisme des lipides y est donc particulièrement intéressante mais reste encore très peu connue par rapport aux cellules animales ou végétales. Parmi ce métabolisme, nous nous sommes intéressés aux gouttelettes lipidiques (LD) et aux triacylglycerols (TAG), les lipides qui les composent majoritairement.

La morphologie des LD altérée couplée à l'accumulation de TAG que nous observons dans les lignées KO Seipin pourrait résulter de changements dans la synthèse des lipides, comme cela a été suggéré dans plusieurs études (Fei *et al.*, 2008; Boutet *et al.*, 2009; Fei, Du and Yang, 2011; Fei, Shui, *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011). Bien qu'il n'ait pas été montré chez *Phaeodactylum* que les enzymes formant les TAG s'associaient directement aux LD depuis le RE, comme c'est le cas chez d'autres organismes (Yoneda *et al.*, 2016; Lupette *et al.*, 2019; Leyland *et al.*, 2020), nous n'excluons pas cette possibilité.

Plusieurs mécanismes peuvent mener à une accumulation des TAG : 1) la néo synthèse par la voie de Kennedy, 2) le recyclage des glycérolipides membranaires et 3) des troubles dans la remobilisation ou la dégradation *via* la lipolyse et l'autophagie (*cf.* Introduction Métabolisme lipidique chez les diatomées, Partie 5). Nous avons exploré ces trois hypothèses pour essayer d'identifier les voies potentiellement impliquées.

## 1.1 Hypothèse d'une synthèse de TAG accrue par la voie de Kennedy

### 1.1.1 La dernière étape de la synthèse des TAG implique les DGAT

La première voie explorée est la néo synthèse des TAG, dite voie de Kennedy ou « *de novo* » sans recyclage de lipides déjà existants. Les acides gras utilisés pour la formation de TAG à partir de DAG peuvent avoir une origine à la fois plastidiale (voie dépendante de l'acyl-ACP) et/ou réticulaire (voie indépendante de l'acyl-CoA et utilisant des acyl-ACP) (Zienkiewicz *et al.*, 2016; T. Huang *et al.*, 2023). La dernière étape de cette voie implique les enzymes DGAT permettant l'estérification d'un dernier acide gras sur un DAG en position *sn*-3 pour former un TAG (*cf.* Métabolisme lipidique chez les diatomées 4.1). Chez *Phaeodactylum*, la récente détection des DGAT dans le protéome du plaste (T. Huang *et al.*, 2023) et leur localisation par étiquette-GFP (Zhang *et al.*, 2021; T. Huang *et al.*, 2023) dans le plaste ou sur la membrane externe du plaste (EpM), appuie fortement l'hypothèse que les TAG puissent être synthétisés à deux sites différents.

L'isoforme *Pt*DGAT1 possède une activité enzymatique importante et favorise l'incorporation des C18:0, C16:0 et dans une moindre mesure des C20:5 (Guihéneuf *et al.*, 2011) dans les TAG. La *Pt*DGAT3 exprimée en levure semble favoriser les substrats C16 :1 et C18 :1 (Cui *et al.*, 2013, 2018). Au vu des profils des espèces de TAG que nous avons présentés dans le Chapitre 2 et dans le Chapitre 3, des tendances à l'augmentation des espèces de TAG 16:1\_18:1\_16:0 et 16:1\_18:1\_16:1 étaient constatées, dans des proportions néanmoins assez faibles qui ne permettraient pas à elles seules d'expliquer la différence entre sauvage et mutant *Seipin*.

Dans l'hypothèse où toutes les DGAT seraient réprimées par la *Seipin*, il serait difficile d'observer une signature particulière dans les acides gras incorporés au vu de leur large éventail de substrats combinés. En revanche, l'augmentation des espèces de TAG possédant du 16:1 et du 18:1 pourrait traduire une légère augmentation de l'activité de *Pt*DGAT3 spécifiquement.

## 1.2 Augmentation de l'activité des GPAT

Les GPAT interviennent tout au début de la voie de Kennedy par l'estérification du premier acide gras sur un G3P pour former du LPA. Chez *Phaeodactylum*, la surexpression d'une GPAT identifiée et localisée au plaste augmente la proportion totale d'acides gras poly insaturés (C16:3, C18:2, C20:5) au détriment des acides gras non saturés et mono saturés (C14:0, C16:0, C18:0 et C18:1) (Niu *et al.*, 2016). Cette étape dans le métabolisme a lieu en amont de la synthèse de tous les autres glycérolipides. Nous pouvons donc supposer que si les GPAT étaient atteintes, les modifications dans les proportions d'acides gras auraient été retrouvées dans toutes les autres classes de glycérolipides, ce qui n'est pas le cas. Il paraît assez peu probable que les GPAT soient affectées.

## 2 Hypothèse du recyclage des glycérolipides

### 2.1 Recyclage des glycérolipides par une PDAT

La deuxième manière de fabriquer des TAG est catalysée par une phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) qui utilise un phospholipide (Dahlqvist *et al.*, 2000) ou bien un galactolipide comme donneur d'acyl (Zhang *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2012; Zienkiewicz *et al.*, 2016). Chez la levure *S.cerevisiae*, il semblerait que les phospholipides PE et PC soient le substrat privilégié de la PDAT.

Dans les algues, les PDAT ont suscité assez peu de travaux jusqu'à maintenant. Deux gènes ont été identifiés comme homologues putatifs de PDAT chez *Phaeodactylum* mais n'ont pas encore été caractérisés (Mus *et al.*, 2013; Alipanah *et al.*, 2015). Une PDAT (NoPDAT) a néanmoins été caractérisée chez la microalgue *Nannochloropsis oceanica* (de la famille des Haptophytes également issus d'une endosymbiose d'une algue rouge comme les Hétérocontes – *Phaeodactylum*) (Yang *et al.*, 2022). La taille de *N.oceanica* rend difficile les observations microscopiques et la localisation de NoPDAT a donc été réalisée chez *P.tricornutum*. Elle y a été localisée sur la membrane Epi-plastidiale (EpM) lorsqu'elle est étiquetée par la GFP. Il a été montré chez *N.oceanica* que NoPDAT pouvait utiliser des phospholipides et des glycolipides comme donneur d'acyl, avec une préférence pour la PE et le PG. La surexpression de NoPDAT provoque l'accumulation de TAG et les lignées Knock down (KD) une diminution des TAG et une augmentation des PE et PG avec des acides gras en 16:0, 16:1 ou 18:1 en position *sn-2*, ce qui suggère que ces espèces ne sont plus utilisées comme substrats et s'accumulent.

Une signature très similaire est observée lorsque nous avons caractérisé les espèces composant la PE et la PC dans les mutants Seipin (Chapitre 2 – **Figure 66**). Nous avons pu y observer une proportion plus importante des classes comportant une combinaison de C16 et C18 (et notamment des C16:1 et C18:1). Inversement, la proportion des espèces comportant des VLC-PUFA (C20:5) diminue. L'hypothèse que *PtSeipin* pourrait interférer avec une PDAT est pour le moment très spéculative et nécessite que des travaux soient menés en ce sens, en commençant notamment par la caractérisation de PDAT chez *P.tricornutum*.

## 3 Hypothèse d'un recyclage des TAG affecté

L'établissement du protéome de la LD chez les mutants KO nous a permis de faire émerger une dernière hypothèse. Les TAG pourraient s'accumuler chez les mutants *P.tricornutum* du fait d'un recyclage affecté des lipides neutres composant la LD. Chez les diatomées la synthèse de TAG suit un rythme circadien avec l'accumulation pendant la période de lumière et la consommation à l'obscurité (Guéguen *et al.*, 2021). Nous avons supposé que la dégradation à l'obscurité soit affectée et plusieurs points nous poussent à considérer très sérieusement cette hypothèse.

### 3.1 *La StLDP est impliquée dans l'hydrolyse des TAG et n'est plus recrutée à la LD*

Premièrement, nous avons pu constater que la StLDP, la protéine majoritaire des LD est très significativement diminuée de la fraction LD purifiée. Comme nous avons pu le voir en Introduction, la Seipin recrute activement des partenaires protéiques depuis la membrane du RE vers la surface de la LD. Malgré le fait que StLDP ne soit pas un homologue de séquence des LDAH/LDIP (Homme/plante) décrit dans la littérature, il paraît très probable que le mécanisme moléculaire sous-jacent soit conservé entre Seipin et StLDP. La mutation de StLDP par CRISPR-Cas9 aboutit à un phénotype très similaire à celui que nous obtenons avec la mutation Seipin (LD surdimensionnées, accumulation de TAG) (Taparia *et al.*, 2021b). De plus, les mutants KO pour StLDP présentent des défauts de dégradation des LD similaires à ceux des KO Seipin (I. Khozin-Goldberg, communication personnelle). Nous pouvons supposer que 1) la StLDP permettrait de structurer la surface de la LD et d'empêcher ainsi la fusion de LD. Si la StLDP est absente, la fusion de plusieurs LD pourrait aboutir à une LD surdimensionnée. 2) la StLDP est essentielle pour effectuer le recyclage des lipides. La protéine StLDP permettrait soit d'adresser correctement des lipases à la surface de la LD ainsi qu'une proximité entre la LD à des compartiments permettant le recyclage comme la mitochondrie ou le peroxisome ou bien permettrait l'adressage de structures de type autophagosomales par le motif ATG8 identifié sur StLDP. 3) La StLDP permet le fractionnement des LD en plusieurs petites LD, ce qui facilite leur dégradation par lipolyse/lipophagie. En sortie de carence nutritionnelle, il a été montré que les LD sont fractionnées, ce qui a pour effet d'augmenter la surface accessible pour la dégradation (Murison, Hérault, Côme, *et al.*, 2023).

### 3.2 *Liaison de la LD à la mitochondrie*

Une étude protéomique de la LD de la diatomée *Fistulifera solaris* a montré que des protéines associées à la LD étaient reliées au trafic membranaire (Clathrine, Hsp70, liaison au calcium) (Nonoyama *et al.*, 2019). La clathrine et Hsp70 sont des facteurs importants pour la formation des lysosomes et la lipophagie dans les cellules mammifères, il a été supposé qu'elle intervient également chez les diatomées (Tanaka, Yoneda and Maeda, 2022). La dégradation des TAG est supprimée en présence d'inhibiteur du trafic membranaire et de la lipophagie chez *Fistulifera* et *Phaeodactylum* (Nonoyama *et al.*, 2019; Tanaka, Yoneda and Maeda, 2022).

Les données de protéomique que nous avons présentées dans le Chapitre 3 suggèrent qu'un lien entre la LD et la mitochondrie est perturbé chez les mutants Seipin. Cela pourrait concerner des points de contacts physiques directement assurés par la Seipin. La localisation de la Seipin aux contacts RE-mitochondrie a été montrée chez l'Homme (Combot *et al.*, 2022). Les auteurs ont également montré que le transport de calcium depuis le réticulum vers la mitochondrie est affecté

dans les mutants Seipin et nos données de protéomique ont révélé que plusieurs protéines liant du calcium voient leur abondance modifiée chez les mutants.

### 3.3 Dégradation des TAG dans la mitochondrie

La mitochondrie est le siège de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la cellule animale. Contrairement aux plantes et aux algues verte, les diatomées utilisent également la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, probablement héritée de l'hôte pendant l'endosymbiose secondaire (Jallet *et al.*, 2020). En effet, aucun gène mitochondrial d'origine algue rouge n'a été retrouvé dans le génome nucléaire des diatomées, ce qui renforce l'hypothèse que seule la mitochondrie de l'hôte a été conservée (Prihoda *et al.*, 2012). Comme nous l'avons montré dans le Chapitre 1, l'origine évolutive de la Seipin chez les diatomées provient également de l'hôte et nous pouvons ainsi supposer que des mécanismes d'interaction mitochondrie-Seipin-LD dans le catabolisme des acides gras soient conservés entre les cellules animales et les diatomées.

Il a été montré chez *Phaeodactylum* que le catabolisme des TAG pendant la phase de nuit était dominé par la voie mitochondriale (Jallet *et al.*, 2020). En effet, lorsque cette voie est bloquée dans des KO PtMACAD1, les TAG s'accumulent et une quantité de TAG très similaire est observée entre les phases de jour et de nuit. De manière très intéressante, la proportion d'acides gras totaux présente au crépuscule est enrichie en acides gras courts, 16:0 et 16:1 qui sont majoritaires dans les LD et diminués en C20:5. La tendance est inverse à l'aube, ce qui laisse supposer l'utilisation des C16:0 et C16:1 durant la phase de nuit qui sont élongués et désaturés pour la production du C20:5. Cette signature est également observée dans les mutants KO Seipin avec une très forte augmentation des acides palmitiques (C16:0) et palmitoléique (C16:1) et une diminution de l'EPA (C20:5), notamment lorsque les cellules sont cultivées sous condition de forte lumière pendant la phase de jour (Chapitre 2, **Figure 62**).

La protéine CGI-58 est une protéine activatrice des lipases dont un homologue a été localisé à la mitochondrie chez *Phaeodactylum* de manière différente à ce qui a été rapporté chez les animaux (LD) et les plantes (peroxisome) (Shu, Pan and Hu, 2022). La surexpression de CGI-58 augmente la quantité de TAG chez *Phaeodactylum* contrairement aux plantes, aux animaux et même à la diatomée centrique *Thalassiosira pseudonana* où c'est la mutation qui mène à ce phénotype d'accumulation (Shu, Pan and Hu, 2022), ce qui semble cohérent si l'on considère CGI-58 comme une lipase. La surexpression augmente l'incorporation des C20:5 dans les TAG et diminue les C16:0 et C16:1. Au laboratoire, une étude préliminaire avait établi par ARN interférence, réduisant l'expression de CGI-5,8 qu'à l'échelle de la cellule entière, une diminution des C20:5 et une augmentation des C16:0, C16:1 et C18:1 étaient observées (Lupette, 2018). Le rôle de CGI-58 chez

*Phaeodactylum* est encore assez flou mais il a été proposé qu'elle permette le recyclage de l'EPA (C20:5) après la dégradation des phospholipides.

#### 4 Conclusion

Les trois hypothèses que nous avons présentées ne sont pas mutuellement exclusives et s'articulent probablement entre elles de manière très fine afin d'assurer une gestion efficace du flux énergétique dans la cellule. Il se révèle que la Seipin est un acteur majeur dans cette organisation dont la perturbation est traduite par les dérégulations multiples que nous avons présentées précédemment.

Ensemble, ces résultats mettent en lumière que la Seipin semble essentielle pour le conditionnement précis du devenir de la LD ainsi que pour préparer sa dégradation et ce, dès le stade de la biogenèse en y recrutant et en y associant un cortège protéique précis.

Les diatomées, issues d'une histoire évolutive complexe faisant intervenir plusieurs évènements d'endosymbioses sont des organismes encore très peu compris. Elles présentent un mélange unique de caractéristiques interconnectées de manière étonnante et dont les mécanismes moléculaires sont peu à peu décryptés. Il est nécessaire de prendre en considération ces éléments lorsque l'on travaille sur ces étonnants organismes. La Seipin et le métabolisme des lipides obéissent à cette règle et les travaux présentés dans ce manuscrit permettent d'amorcer et d'apporter des éléments inédits dans la compréhension du rôle architectural de la Seipin et de son importance pour la vie de la LD chez *Phaeodactylum tricornutum*.



## Matériels et méthodes

### 1 Organismes modèles et conditions de cultures cellulaires

#### 1.1 La diatomée *Phaeodactylum tricornutum*

*Phaeodactylum tricornutum* est une diatomée pennée présentant un axe de symétrie axiale longitudinale. C'est un modèle d'étude très répandu en laboratoire pour comprendre la biologie des diatomées. Le génome est entièrement séquencé (Bowler *et al.*, 2008) et a été réannoté dans sa troisième version (Phatr3). La souche est devenue une référence de par sa facilité à la maintenir en culture dans des conditions de laboratoire. De nombreux outils ont ainsi été développés et sont disponibles tels que les techniques de transformation de son génome par biolistique (Apt, Kroth-Pancic and Grossman, 1996; Falciatore *et al.*, 1999) ou bien, plus récemment, la transformation par conjugaison bactérienne conduisant à la formation d'un épisode (Karas *et al.*, 2015; Diner *et al.*, 2016).

##### 1.1.1 Souche Pt1

Toutes les expérimentations ont été réalisées avec la souche *P.tricornutum* (Bohlin 1897) écotype Pt1 (souche 8.6, CCAP 1055/3) issue de la collection de Pravosali-Guillard du *National Center for Marine Algae and Microbiota* (NCMA).

#### 1.2 Méthodes générales de cultures

##### 1.2.1 Milieu artificiel eau de mer riche en nutriments

Le milieu ESAW (Enriched Seawater, Artificial Water) est utilisé pour la culture des diatomées. Sa composition est la suivante : NaCl (326.7 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25 mM), KCl (8.03 mM), KBr (0.725), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.372 mM), NaF (0.0657 mM), MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O (47.18 mM), CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O (9.134 mM), SrCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O (0.082 mM), Fe-EDTA (8.17 μM), Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O (8.3 μM), ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (0.254 μM), CoCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O (0.0672 μM), MnCl<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O (2.73 μM), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O (6.12 nM), Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (1 nM), NiCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O (6.27 nM), CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O (0.039 nM), vitamine B8 (4.09 nM), vitamine B12 (0.738 nM), vitamine B1 (0.593 μM), NaNO<sub>3</sub> (0.549 mM), et NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (0.022 mM).

Ce milieu enrichi est désigné comme ESAW 10N10P (Abida *et al.*, 2015). Dans les travaux présentés ici, des milieux dépourvus d'azote (NaNO<sub>3</sub>) ou de phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O) seront respectivement abrégés ESAW 0N10P et ESAW 10N0P. Le milieu liquide est préparé en conditions stériles et conservé à température ambiante à l'abri de la lumière.

La culture des cellules sur milieu solide est réalisée sur des boîtes de pétri ESAW 10N10P complété par de l'Agar (1% m/v) autoclavé. Différents antibiotiques sont rajoutés dont la Carbénicilline (0,237 μM) pour laquelle *P.tricornutum* est résistante naturellement et permettant de



conserver des conditions de cultures axéniques. En fonction des résistances conférées par les vecteurs d'expressions transformés dans *P.tricornutum* (voir 3.2.3), les antibiotiques Zéocine (0.07  $\mu\text{M}$ ) ou Blastidicine (0.028  $\mu\text{M}$ ) sont ajoutés au milieu avant polymérisation de l'Agar. Tous les composants sont ajoutés en conditions stériles.

#### 1.2.2 Maintien des lignées en milieu solide

Les microalgues sont maintenues à long terme sur le milieu solide précédemment décrit et sont transférées sur une nouvelle boîte et un milieu frais toutes les 4-6 semaines.

#### 1.2.3 Cultures en milieu liquide

Les cellules sont cultivées et amplifiées depuis un milieu solide vers un milieu liquide par culture successive dans des erlenmeyers en verre de volumes croissants 25mL, 100mL, 250mL, 1L ou 5L. Le volume total de culture n'excède pas  $1/5^{\text{e}}$  de la capacité de l'erlenmeyer soit 5mL, 20mL, 50mL, 200mL ou 1L respectivement. Les cultures sont placées dans un incubateur (INFORS Multitron Pro) sous une température contrôlée de 20°C, agitation constante de 100 rpm et en cycle lumineux jour/nuit de 12h/12h. L'intensité lumineuse est contrôlée à 75  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . La concentration cellulaire initiale est de  $0,5.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup> et est maintenue par dilutions jusqu'à  $10.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup> au maximum.

##### 1.2.3.1 Cultures en carence d'azote ou de phosphate

Des milieux dépourvus d'azote (ESAW 0N10P) ou de phosphate (ESAW 10N0P) sont utilisés pour les expérimentations de mises en carences nutritionnelles. Des lavages sont réalisés pendant le transfert des cellules depuis le milieu riche vers le milieu carencé pour éliminer les traces résiduelles d'azote et de phosphate. Les cellules sont centrifugées à faible vitesse (1000g) pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé et les culots sont resuspendus dans 20mL de milieu carencé. Trois lavages sont ainsi réalisés avant inoculation des culots cellulaires dans le volume de culture souhaité. Pour les carences en phosphate  $1.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup> sont inoculées et pour les carences en azote  $4.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Dans ces conditions de carences, des quantités de cellules plus importantes ont été retenues pour obtenir suffisamment de matériel biologique, car les cellules cessent de se multiplier rapidement (au bout de 24heures environ en condition de carence en azote et 4 jours en carence en phosphate).

##### 1.2.3.2 Culture sous forte lumière

Les expérimentations de stress lumineux ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment décrites (ESAW 10N10P, 20°C, photopériode 12h/12h, agitation 100rpm) mais sous une intensité lumineuse de 200  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Afin de conserver la même intensité lumineuse et limiter les variations d'intensités reçues par les algues au cours de la cinétique de culture, les

volumes de cultures par erlenmeyer n'excèdent pas 50mL. Plusieurs cultures en parallèles sont alors réalisées lorsque de larges volumes sont requis, par exemple pour les purifications de gouttelettes lipidiques (LD) (voir 5.2).

### 1.3 Récolte cellulaire

Les cultures cellulaires ont été récoltées pour extraction et analyses des composés d'intérêts. Les cultures sont centrifugées à 3000g pendant 10 minutes et le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans le volume résiduel de surnageant et transféré dans un microtube 1.5mL avec traitement anti-adhésif (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, Sorenson, USA). Une deuxième centrifugation permet d'éliminer complètement le surnageant à l'aide d'une micropipette. Les culots de cellules sont instantanément congelés par immersion dans de l'azote liquide puis stockés à -80°.

#### 1.3.1 Récolte des surnageants de culture

Les surnageants de culture sont récoltés dans des tubes Falcon de capacité 50mL. Pour chaque triplicat de culture, 15mL de surnageant sont prélevés et rassemblés dans le tube 50mL que l'on congèle immédiatement en le plongeant dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

### 1.4 Cryo-préservation

La conservation des souches à long terme est réalisée par cryo-préservation dans du DMSO 15%. On prélève  $4,5 \cdot 10^7$  cellules d'une culture entre 5 et  $6 \cdot 10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Les cellules sont centrifugées à 2000g pendant 10 minutes puis resuspendues dans 4,5mL de milieu ESAW 10N10P. Des aliquots de 0,9mL sont prélevés auquel on ajoute 0,9mL de DMSO 20% (dilué dans du milieu ESAW 10N10P). Les cellules sont congelées progressivement en plusieurs étapes jusqu'à -80°C comme suivant : une heure à 4°C puis 1 heure à -20°C puis indéfiniment à -80°C. La sortie de cryo-préservation se fait par ajout immédiat de 8,2 mL de milieu ESAW 10N10P à température ambiante. Le surnageant est éliminé par centrifugation (2000g, 5 minutes) et le culot cellulaire est resuspendu immédiatement dans 1mL de milieu ESAW 10N10P dans un erlenmeyer en verre de capacité 5mL que l'on place dans la condition de culture décrite partie 1.2.3.

## 2 Culture et transformation des levures *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.1 Souche BY4741

La lignée de levure *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 dérive de la lignée S288C elle-même utilisée dans les projets de séquençages de génome. La lignée BY4741 en diffère par des mutations dans les gènes de synthèse de trois acides aminés essentiels (histidine, leucine et lysine), dans le gène de synthèse de l'uracile, essentiel à la synthèse d'ARN. Le gene MAT (« Mating of Yeast »), essentiel au processus de reproduction sexuée entre deux cellules haploïdes est également muté empêchant ainsi tout phénomène de recombinaison méiotique. Le génotype de BY4741 est donc « MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1

leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ». Les lignées de ce type, c'est-à-dire mutées dans des voies métaboliques essentielles sont régulièrement utilisées en laboratoire comme support cellulaire pour transformation par des plasmides contenant entre autres, une cassette d'expression spécifique restaurant la capacité de synthèse d'un des métabolites essentiels manquant. Cela permet ainsi la sélection des cellules transformées sur le milieu déplété adéquat.

La lignée BY4741 est utilisée comme référence sauvage pour l'analyse des lipides et du phénotype des LD dans les expérimentations menées et sera nommée « WT » dans les résultats (Chapitre 2).

### 2.1.1 Souche mutante Seipin Ylr404wΔ complémentée ou non

La lignée Ylr404wΔ est une lignée mutante pour le gène Seipin (gene FDL1) chez *S.cerevisiae*. Plus récemment, on retrouve le nom SEI1 faisant évidemment référence au gène mammifère Seipin avec lequel des similarités de séquences et de fonctions sont partagées. La lignée Ylr404wΔ présente un génotype similaire à BY4741 auquel s'additionne la mutation Seipin « MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YLR404W::KanMX4 » nous a été fournie par Marine Froissard (IJPB, INRAE Versailles). Nous avons utilisé cette lignée pour la complémentation par les isoformes de Seipin issues d'*Arabidopsis thaliana*, de *Phaeodactylum tricornutum* et de *Saccharomyces cerevisiae* (voir construction des vecteurs, partie 3.2.4). Dans les expérimentations menées, la lignée non complémentée est référencée « KO Seipin » tandis que les lignées complémentées sont respectivement référencées « AtSeipin », « PtSeipin » et « ScSeipin ».

## 2.2 Culture en milieu liquide

Avant transformation par le vecteur YCplac33, les lignées BY4741 et Ylr404w sont cultivées dans un milieu complet YPD (extraits de levure 1%, peptone 2% et glucose D 2% p/v) (YPD Broth Powder, MP Biomedicals). Après transformation par le vecteur YCplac33 et pour les différentes expérimentations menées, les cellules sont cultivées dans le milieu d'un mélange complet de suppléments (CSM) d'acides aminés déplété en Uracile (CSM-URA) (MP Biomedical) avec du glucose (20g/L) comme source de carbone. Pour les expérimentations, les cellules sont inoculées à une densité optique faible ( $DO_{600nm}=0,01$ ) dans un volume final de 30mL (Erlenmeyer de 100mL).

Un test de croissance précis est réalisé par lecture de l'absorbance à 600nm (Tecan® MInfinite 1000pro) sur une plaque 96 puits à fond transparent (Thermo Fisher Scientific, Référence 142010). Un volume de 300μL de culture à 0,05 DO est déposé par puits et une lecture de densité est effectuée toutes les heures pendant 82h.

## 2.3 Culture en milieu solide

Avant transformation par le vecteur YCplac33 (voir partie 3.2.4), les cellules sont cultivées sur milieu solide YPD (extraits de levure 1%, peptone 2%, glucose D 2% p/v et Agar 2%) (YPD Broth Powder, MP

Biomedicals) ; après transformation par YCplac33, les cellules sont cultivées sur milieu YNB-URA (Yeast Nitrogen base, VWR Chemicals).

#### 2.4 Récolte cellulaire

Les cultures sont récoltées pour différentes analyses incluant des observations au microscope confocal ou au microscope à épifluorescence, des extractions et analyses de lipides et des extractions et analyses de protéines par Western Blot. Les cultures sont récoltées en fin de phase exponentielle, lorsque la DO est comprise entre 2 et 3. Pour la lignée complétée par *PtSeipin* dont la croissance est affectée, deux points de prélèvements ont été réalisés : un point en même temps que les autres lignées et un point lorsque sa DO est comprise entre 2 et 3.

Un millilitre de culture est prélevé pour les analyses microscopiques. Les cellules sont centrifugées (3 minutes à 3000g) puis resuspendues dans 40 $\mu$ L de milieu de culture CSM-Ura, auquel on ajoute 10 $\mu$ L de Nile Red (2,5 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> dans 100% DMSO).

Les récoltes pour analyses de lipides sont réalisées à partir de triplicas de cultures, tandis que les récoltes pour analyses de protéines à partir de réplicas simples. Les cultures sont centrifugées (5 minutes 3000g) et lavées dans une solution saline NaCl 0,9%. Une nouvelle centrifugation permet de se débarrasser du surnageant et les culots cellulaires sont resuspendus dans le volume résiduel. Les culots des échantillons destinés à l'extraction et l'analyse de lipides sont transférés dans des tubes Low Binding (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, Sorenson, USA) et pour l'analyse de protéines dans des tubes de Precellys (Precellys Lysing Kit, Bertin technologies). Une dernière centrifugation permet d'éliminer le liquide résiduel et les échantillons sont congelés instantanément dans de l'azote liquide avant conservation à -80°C.

#### 2.5 Cryo préservation

La cryo préservation des lignées est réalisée à partir d'une culture en phase de croissance exponentielle. Pour cela, 600 $\mu$ L de cultures sont déposés dans un tube contenant 400 $\mu$ L de glycérol, 50% préalablement autoclavé. La culture cellulaire y est correctement homogénéisée avant congélation à -80°C.

### 3 Biologie moléculaire

#### 3.1 Réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est un processus enzymatique permettant l'amplification d'une séquence d'ADN. Ce processus a été découvert par Kary Mullis en 1983 lui valant le prix Nobel de chimie en 1993. La réaction fait intervenir plusieurs cycles comprenant chacun

une étape de dénaturation de l'ADN double brin, d'hybridation d'amorces complémentaires et d'élongation du brin d'ADN néoformé complémentaire au brin parent.

### 3.1.1 Polymérase Phire

La polymérase Phire (ThermoFisher Scientific, Phire Plant Direct PCR Master Mix) présente une sensibilité et est optimisée pour modèles végétaux. Elle est utilisée en routine par le laboratoire pour les criblages et séquençages. Des cellules sont soit prélevées sur milieu solide et diluées dans le « dilution buffer » fourni par le fabricant, soit prélevées en milieu liquide et diluées au dixième dans le même tampon. Après avoir chauffé pendant 10 minutes à 95°C, 1µL est utilisé comme matrice pour la réaction. Les amplifications ont été réalisées en suivant les recommandations du fabricant pour un volume final de 25 ou 50µL de réaction. Les étapes de dénaturation de l'ADN ont été réalisées à 98°C, l'hybridation des amorces entre 60 et 65°C et l'élongation à 72°C. La vitesse de réplication de la Phire est de 20s/kb, les durées d'élongations ont donc été ajustées en fonction de la taille des fragments à amplifier.

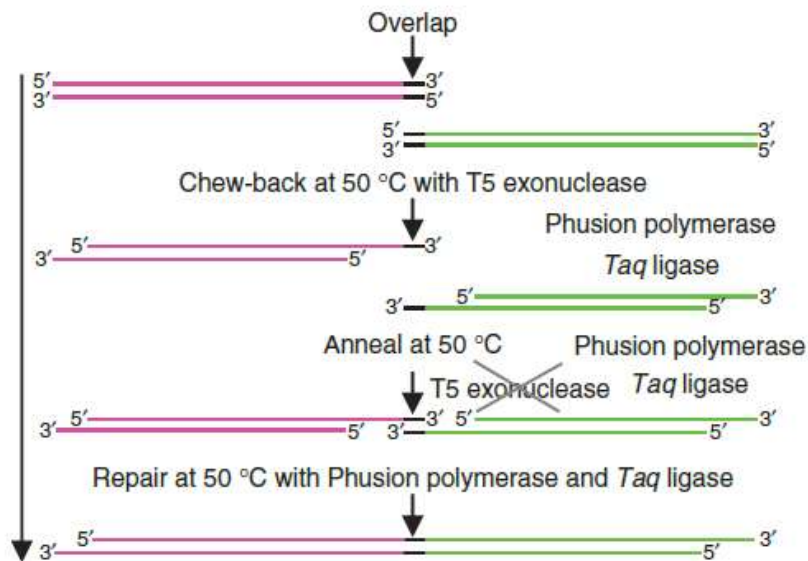
### 3.1.2 Polymérase Phusion

L'enzyme Phusion (Thermo Fisher Scientific) est une polymérase avec un taux de fidélité de réplication extrêmement élevé. Cette enzyme est utilisée par le laboratoire principalement pour des clonages de séquences codantes et éviter toute erreur de réplication pouvant introduire des mutations dans une séquence codante que l'on souhaite exprimer *in vivo*. Les fragments d'ADN ont été amplifiés en suivant les recommandations du fabricant.

## 3.2 *Clonage et constructions de vecteurs d'expression*

### 3.2.1 Construction de vecteurs par la technique d'assemblage de Gibson

La technique d'assemblage de Gibson (Gibson *et al.*, 2009) permet l'assemblage de plusieurs fragments d'ADN en une réaction isothermale. Cette technique nécessite que les séquences des

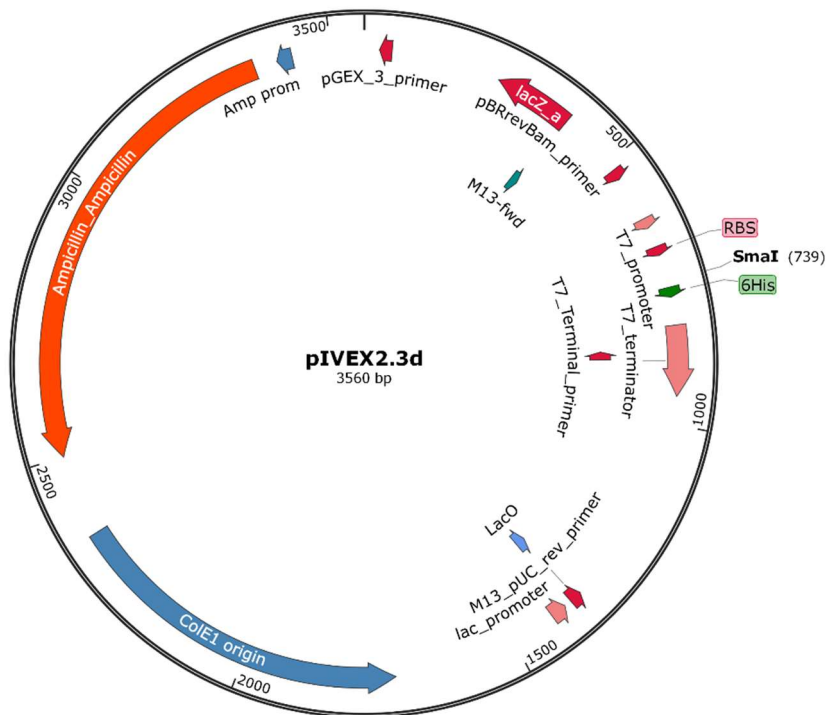


**Figure 94 : Principe du clonage Gibson par recombinaison isothermale *in vitro* en une seule étape.** L'activité exonucléase 5' enlève les séquences d'extrémité 5' et expose la séquence complémentaire pour l'hybridation. L'activité polymérase complète les espaces sur les régions d'annealing. Une ADN ligase scelle ensuite le tout de manière covalente. L'ensemble des réactions s'effectue à 50°C pendant 1 heure. (D'après Gibson *et al.*, 2009).

fragments souhaitant être assemblés se superposent et soient complémentaires sur une vingtaine de nucléotides. Plusieurs activités enzymatiques interviennent alors, une exonucléase 5' digère les séquences de 5' en 3', permettant aux séquences complémentaires de s'hybrider. Les simples brins complémentaires s'hybrident, puis une ligase complète les parties manquantes (**Figure 94**). Plusieurs fragments peuvent être assemblés simultanément. De par sa simplicité d'exécution et son efficacité, cette technique est désormais très répandue en biotechnologies et en biologie synthétique et a permis par exemple l'assemblage d'un génome bactérien entier à partir de centaines de fragments isolés (Gibson *et al.*, 2010).

### 3.2.2 Vecteur d'expression en système *in vitro*

Afin d'obtenir une quantité suffisante de protéine Seipin de *P.tricornutum* pour des tests biochimiques, un système d'expression *in vitro* a été utilisé. Le plasmide pIVEX2.3d a été fourni par Lionel Imbert de la plateforme Cell Free, IBS, Grenoble. Le plasmide comporte un gène de résistance à l'Ampicilline pour sélection dans des bactéries, une séquence promotrice et terminatrice T7 utilisée par la machinerie de transcription *in vitro*, et un tag 6-Histidines.



**Figure 95 : Carte du plasmide pIVEX2.3d.** Ampicillin\_Ampicillin : résistance à l’Ampicillin; ColE1 origin : origine de répllication bactérienne; lacO : bacterial lac operator; lacZ\_a, lacZ alpha gene; RBS : Site de fixation Ribosomal ; 6His : tag Histidine ; SmaI : Site de restriction utilisé pour linéariser le vecteur.

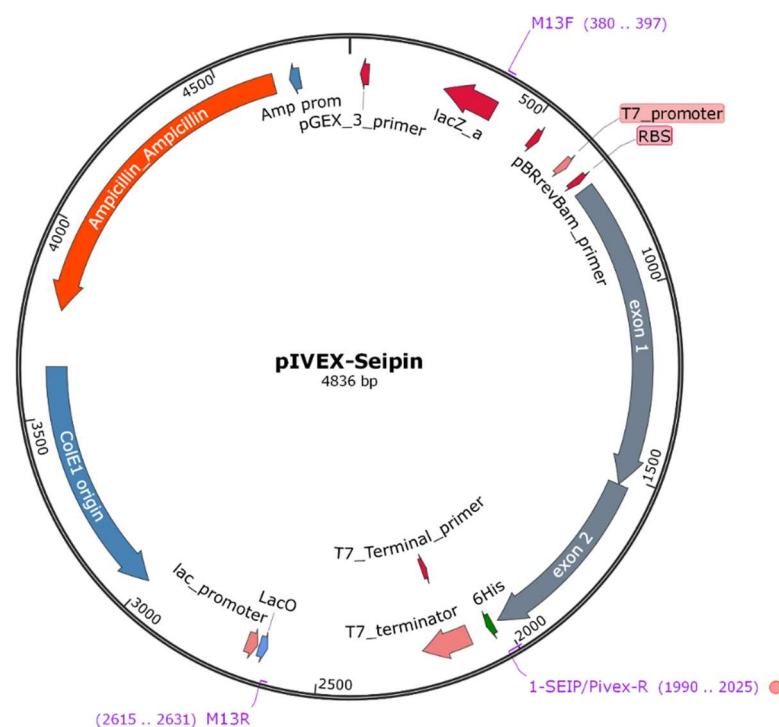
La stratégie de clonage de la séquence codante de PtSeipin dans le vecteur d’expression pPHA-T1\_eGFP (voir 3.2.3) est la suivante. Des amorces Gibson sont mises au point (**Tableau 6**) pour amplifier par réaction de polymérisation en chaîne (polymérase Phusion, voir 3.1.2) la séquence codante Seipin (**Tableau 6**, couple d’amorce 1-SEIP/Pivex). D’autre part, 1µg de vecteur pIVEX3.2d est digéré par l’enzyme de restriction SmaI (coupe franche) pendant une heure à 25°C. Un traitement à la SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) est réalisé à 37°C pendant 30 minutes pour empêcher le vecteur de se refermer sur lui-même. Le mix de réaction Gibson est réalisé en respectant un ratio molaire de 3 :1 (calculé avec l’outil NEBioCalculator, <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) entre le vecteur linéarisé et le produit d’amplification PtSeipin. Le produit de ligation est transformé dans des bactéries compétentes (voir 3.4.1). À partir des colonies résistantes, les plasmides sont purifiés par miniprep (NucleoBond Mini Prep, Macherey-Nagel) en suivant les recommandations du fabricant, puis soumis au séquençage Sanger par le couple d’amorce M13 (**Tableau 6**).

**Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour l’assemblage par clonage Gibson et le séquençage du vecteur d’expression pIVEX-Seipin.**

Nom de l’amorce	Séquence (5’->3’)	Partie amplifiée	Matrice ADN
-----------------	-------------------	------------------	-------------

1-SEIP/Pivex- F	CCATGGCACATATGGACCGACGCGTTTCCCGAC	PtSeipin	pPHA- T1_eGFP_SeipinGFP
1-SEIP/Pivex- R	AACCCCCCGGGAATAGCTTCGGCTGGAGTAACC	PtSeipin	pPHA- T1_eGFP_SeipinGFP
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC		
M13F	TGTA AACGACGGCCAGT		

Le vecteur d'expression pIVEX-Seipin ainsi construit **Figure 96** a été purifié par midiprep (Nucléospin Xtra Midi, Macherey Nalgel) à partir de 200mL de culture bactérienne en suivant les recommandations du fabricant. Le plasmide a été dilué à une concentration de 1µg/µL et confié à



Lionel Imbert (IBS) pour l'expression en système *in vitro*.

**Figure 96 : Carte du plasmide pIVEX-Seipin construit.** Le plasmide a été utilisé pour l'expression *in vitro* de la Seipin de *Phaeodactylum*. Ampicillin\_Ampicillin : résistance à l'Ampicillin; ColE1 origin : origine de répliation bactérienne; lacO : bacterial lac operator; lacZ\_a, lacZ alpha gene; RBS : Site de fixation Ribosomal ; 6His : tag Histidine ; SmaI : Site de restriction utilisé pour linéariser le vecteur.

### 3.2.3 Vecteur de surexpression chez *Phaeodactylum tricornutum*

Un vecteur permettant l'expression de séquences codantes a été utilisé pour la surexpression de la Seipin couplée à la GFP chez *P.tricornutum*. Plusieurs fragments ont été amplifiés par PCR avec des

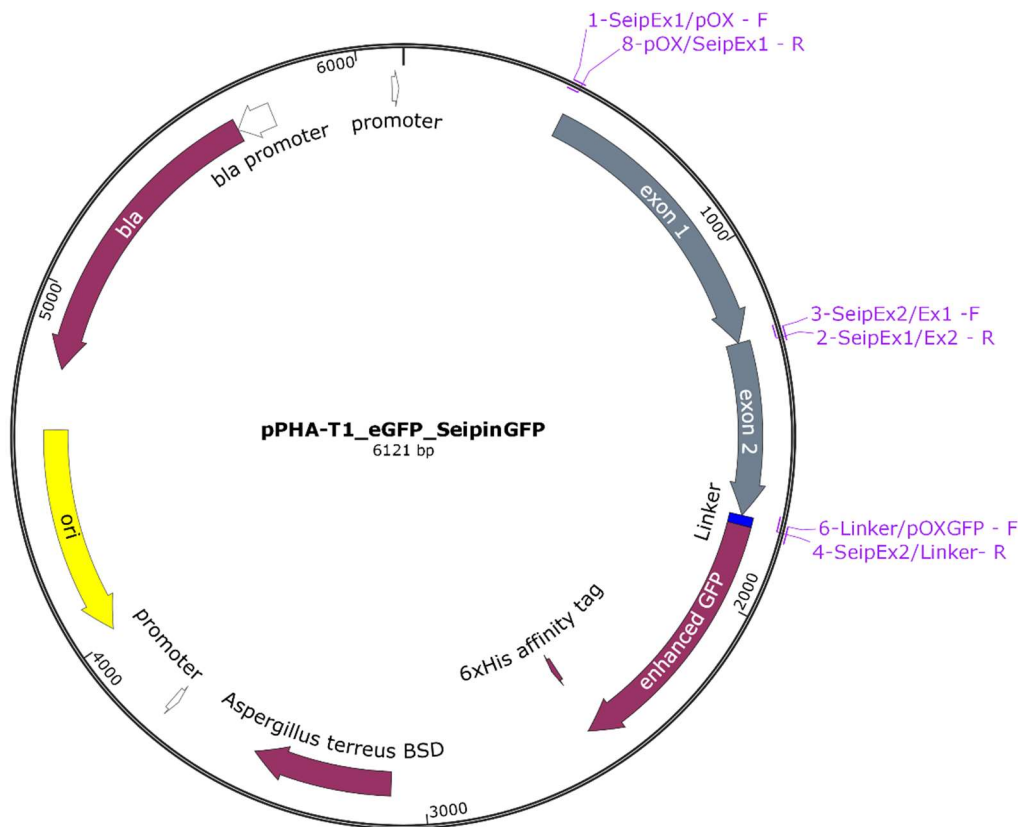


amorces conçues en prévision d'un clonage Gibson, présentant ainsi des extrémités libres complémentaires du futur fragment avec lesquelles elle devra s'hybrider (Tableau 3). Le plasmide pPHA-T1\_eGFP a été amplifié par PCR (polymérase Phusion) dans sa totalité permettant 1) de le linéariser précisément à l'emplacement souhaité et 2) d'y inclure des extrémités en vue du clonage Gibson. D'autre part, la séquence codante de la Seipin de *P.tricornutum*, c'est-à-dire les exons 1 et 2 ont été amplifiés séparément par PCR par la polymérase Phusion à partir de l'ADN génomique. L'ensemble des amorces utilisées sont listées dans le **Tableau 7**. Ces fragments ont ensuite été assemblés par la réaction de Gibson (cf Matériel et Méthodes, partie 3.2.1) puis transformé dans des bactéries compétentes (voir 3.4.1).

**Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour l'assemblage par clonage Gibson du vecteur d'expression pPHA-T1\_eGFP\_SeipinGFP.**

Nom de l'amorce	Partie amplifiée	Séquence (5'->3')	Couplée avec
1-SeipEx1-pOx-F	Seipin exon 1	GTTTCGAGAATTCATGGACCGACG	2
		CGTTTCC	
2-Seip-Ex1-Ex2-R	Seipin exon 1	CAATATATACTTCAGTGGTAAATCC	1
		AGACTTTCC	
3-SeipEx2-Ex1 -F	Seipin exon 2	GGATTTACCACTGAAGTATATATTG	4
		GTCCAAGTCGT	
4-SeipEx2-Linker- R	Seipin exon 2	CCTTGTACAAGAAGGCGGGGTAAA	3
		TAGCTTCGGCTGGAGTA	
6-Linker-pOXGFP - F	Vecteur pPHA-T1_eGFP	CCCGCCTTCTTGTACAAGGTCGCCG	8
		TGAGCAAGGGCGAGGAG	
8-pOX-SeipEx1 - R	Vecteur pPHA-T1_eGFP	CGTCGGTCCATGAATTCTCGAAAC	6
		GGCAGACA	

Le vecteur pPHA-T1\_eGFP\_SeipinGFP ainsi assemblé (**Figure 97**) possède la séquence codante de la Seipin (Exon1 et Exon2) liée à la GFP par un linker pour éviter de perturber les structures tertiaires des deux protéines. Le gène de résistance Blastocidin S deaminase (BSD) de *Aspergillus terreus* confère la résistance à l'antibiotique Blastocidine utilisé pour la sélection des algues après transformation par biolistique (cf Matériel et Méthodes, partie 3.4.3).



**Figure 97 :** Carte du vecteur d'expression pPHA-T1\_eGFP\_SeipinGFP construit par clonage Gibson. Les amorces utilisées pour amplifier les différents fragments sont représentés en violet.

Étant donné que toutes les parties (exons 1 et 2, squelette du vecteur comprenant les gènes de résistance, la séquence codante GFP...) ont été entièrement amplifiées par PCR, la totalité des parties codantes du vecteur a été soumise au séquençage Sanger grâce aux amorces listées **Tableau 8**.

**Tableau 8 :** Liste des amorces utilisées pour séquençage du vecteur pPHA-T1\_eGFP\_SeipinGFP.

Nom de l'amorce	Séquence (5'→3')
<i>S-pOX-1F</i>	CACATTTCCCGAAAAGTGC
<i>S-pOX-1R</i>	CTGTCAGACCAAGTTTACTC
<i>S-pOX-2R</i>	CTGGCCTTTTGCTCACATGT
<i>S-pOX-3R</i>	TTCAGAGATGGGGATGCTGT
<i>S-pOX-4R</i>	CGATAGCACGCTTCTGAAGC

### 3.2.4 Vecteurs d'expression chez *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.2.4.1 Méthode de clonage de séquences codantes

Les séquences codantes des Seipin de *Phaeodactylum tricornutum*, *Arabidopsis thaliana* (Seipin3), *Saccharomyces cerevisiae* ont été amplifiées à partir d'ADN génomique préalablement purifié au laboratoire par Etienne Deragon pour l'ADN de *Phaeodactylum tricornutum* et Morgane Michaud pour l'ADN de *Arabidopsis thaliana* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les séquences ont été amplifiées au moyen d'amorces élaborées en prévision d'un clonage Gibson (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 3.2.1).

#### 3.2.4.2 Construction des vecteurs d'expression

Trois vecteurs différents ont été construits respectivement pour l'expression des Seipin issues de *Arabidopsis thaliana* (isoforme Seipin3), de *Phaeodactylum tricornutum* et de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (gène Fld1) pour des tests de complémentation fonctionnels dans des lignées de levure KO pour la Seipin endogène (lignées Ylr404wΔ mutées pour le gène Fld1). Pour ce faire, plusieurs parties ont été amplifiées par PCR (polymérase Phusion) grâce aux amorces présentées dans le **Tableau 9**.

**Tableau 9 : Liste des amorces utilisées pour l'amplification des différentes parties nécessaires à la construction des vecteurs d'expression des Seipin chez la levure.**

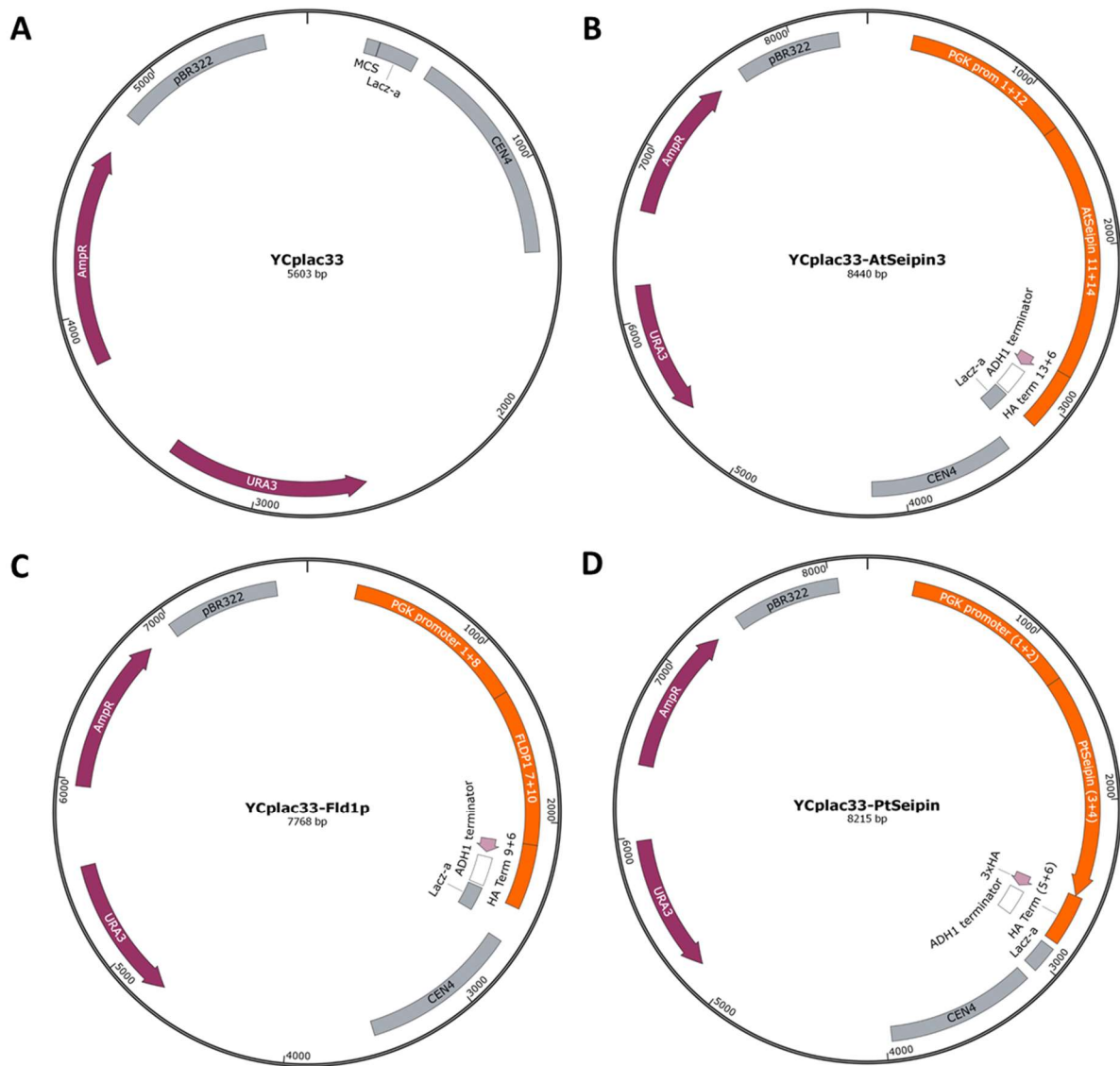
Nom	Partie amplifiée	Matrice ADN	Séquence (5'→3')
ScS1-YCplac-PGKprom-Fwd	PGK promoteur	ADN génomique <i>S.cerevisiae</i>	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGG
ScS2-PGKprom-PtSeipin-Rev			ATCCCCAGACGCGAATTTTTCGAAGA
ScS3-PGKprom-PtSeipi-Fwd	PtSeipin	pPHA-T1_eGFP_SeipinGFP	GGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAA
ScS4-PtSeip-HAterm-Rev			AACAATGGACCGACGCGTTTCC
ScS5-PtSeip-HAterm-Fwd	Ha tag +	pFA6a-3HA-	CATACGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGT
ScS6-HAterm-YCplac-Rev	terminateur	His3MX6-n9	ATGGGTAAGCTTCGGCTGGAGTAACCG
ScS7-PGKprom-Fld1p-Fwd	Fld1p	ADN génomique <i>S.cerevisiae</i>	GACTTGAATTTTATTACTCCGGTTACTCCAGCCGA
			AGCTTACCCATACGATGTTCTGAC
			CGTTGTAAAACGACGCCAGTGAATTCGAGCTC
			GGTACCCCCGGTAGAGGTGTGGTCAAT
			GGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAA
			AACAATGAAAATCAATGTATCCCGTC

ScS10-Fld1p- HAterm-Rev			CATACGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGT ATGGGTAGCTATGTTTCTTGGATTTTTCC
ScS9-Fld1p- HAterm-Fwd	Ha tag +	pFA6a-3HA-	TTTGTTAGAAAGGGTCAGGAAAAATCCAAGAAA CATAGCTACCCATACGATGTTCTCTGAC
ScS13-AtSeip3- HAterm-Fwd	terminateur	His3MX6-n9	CAACAACCTTATATCTTGACGGTCAGGCGGGAAGT AGATACCCATACGATGTTCTCTGAC
ScS12-PGKprom- AtSeip3-Rev	PGK	ADN génomique	TGCTATGTGTTGATGATGATTCTGATTCTGATTCC ATTGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAGATAA
ScS8-PGKprom- Fld1p-Rev	promoteur	<i>S.cerevisiae</i>	GTAAAACTGTAATGGACGGGATACATTGATTTT CATTGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAGATAA
ScS14-AtSeip3- HAterm-Rev	AtSeipin 3	ADN génomique	ATACGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTAT GGGTATCTACTCCCGCCTGACCGTC
ScS11-PGKprom- AtSeipin3-Fwd		<i>Arabidopsis thaliana</i>	GGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAA AACAATGGAATCAGAATCAGAATCATC

Les fragments sont amplifiés à partir de plusieurs matrices d'ADN. Il s'agit d'ADN génomique de *S.cerevisiae* pour le clonage de la Seipin de levure (Fld1) ainsi que du promoteur Phosphoglycerate Kinase (PGK), d'ADN génomique de *A.thaliana* pour le clonage de la Seipin isoforme 3 (AtSeipin3). Le vecteur pFA6a-3HA-His3MX6-n9 (<https://www.addgene.org/41600/>) est utilisé comme matrice pour l'amplification du tag HA couplé au terminateur Alcohol dehydrogenase (ADH1). Enfin, le vecteur précédemment décrit pPHA-T1\_eGFP\_SeipinGFP (*cf* Matériel et Méthodes, partie 3.2.3) est utilisé comme matrice pour l'amplification de la partie codant la Seipin de *P.tricornutum*.

Les fragments ainsi amplifiés sont purifiés sur gel d'agarose ainsi que le produit de digestion du plasmide YcPlac33 (<https://www.addgene.org/vector-database/4858/>) par l'enzyme SmaI. Ce vecteur linéarisé est co transformé dans la levure avec les séquences des promoteurs, terminateurs et séquences codantes des différentes Seipin dans la levure. Ce vecteur comporte les séquences essentielles de répllication du vecteur *in vivo* (CEN4) et de synthèse de l'Uracile (URA3) permettant la sélection des levures transformées sur milieu dépourvu d'Uracile.

Les lignées de levures KO Seipin Ylr404wΔ sont utilisées pour la transformation des parties précédemment décrites.



**Figure 98 : Cartes des plasmides obtenus pour l'expression de différentes Seipin chez la levure *S.cerevisiae*.** (A) : Plasmide YCplac33 comprenant un centromère pour le maintien épisomal en levure (CEN4), un gène marqueur de sélection positive de levure (URA3) permettant de synthétiser de l'Uracile en milieu dépourvu et un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR) pour sélection dans les bactéries. (B,C,D) : plasmides respectivement obtenus pour l'expression des Seipin issues d'*Arabidopsis thaliana* (AtSeipin), de *Saccharomyces cerevisiae* (Fld1p/ScSeipin) et de *Phaeodactylum tricornutum* (PtSeipin).

### 3.3 Purification des acides nucléiques amplifiés

Les acides nucléiques amplifiés sont purifiés avant clonage ou séquençage. La purification est réalisée grâce à un kit commercial (Monarch PCR and DNA Cleanup Kit, New England BioLabs) directement à partir du produit d'amplification ou bien par extraction sur gel d'agarose (Monarch DNA Gel Extraction Kit, New England BioLabs) après migration de l'ADN. La concentration en acides nucléiques et la pureté sont évaluées par l'absorbance à 260nm et par les ratios 260/280 (contaminations par

des peptides) et 260/230 (contaminations par des solvants phénoliques, carbohydrates, polysaccharides, urée...) mesurés au spectrophotometre (NanoDrop 1000).

### 3.4 *Techniques de transformations cellulaires*

#### 3.4.1 Transformation de bactéries compétentes

La transformation de bactéries compétentes (NEB 5-alpha Competent *E. coli*, New England BioLabs) se fait par choc thermique. Cette lignée présente une forte efficacité de transformation. Les cellules sont décongelées sur glace. Entre 2 et 5µL de produit de ligation Gibson sont ajoutés à 50 µl de bactéries et l'ensemble est mis à incuber sur glace 30 minutes. Un choc thermique de 30 secondes à 42 °C est réalisé au bain-marie puis les cellules sont immédiatement placées de nouveau sur glace pendant 5 minutes. Les cellules transformées sont reprises dans 1mL de milieu riche (SOC Outgrowth Medium, New England BioLabs) et placées sous agitation pendant 1h à 37°C. Les cellules sont étalées sur boîtes sélectives LB-Agar avec l'antibiotique adéquat et placée 12h minimum ou jusqu'à l'apparition de colonies résistantes à 37°C.

#### 3.4.2 Transformation des lignées de levures *Saccharomyces cerevisiae*

Les cellules en culture liquide (voir 2.3) en phase exponentielle ( $2 < DO_{600nm} < 3$ ) sont centrifugées (3000g, 3 minutes) et lavées dans de l'eau stérile avant d'être resuspendues dans une solution LiAc-Sorbitol [1M D-Sorbitol dans TE Buffer. (TE buffer : 100mM Lithium acetate, 10mM Tris-acetate, 1mM EDTA, Ph8)] permettant de rendre les cellules compétentes. On introduit successivement une solution de LiAc-PEG (40% m/v PEG 3350 dans buffer TE) qui permet de stabiliser l'ADN à la surface des cellules et d'augmenter la perméabilité des cellules puis au moins 15ng de plasmide YCplac33 linéarisé par Smal, ainsi que les fragments d'ADN clonés que l'on souhaite transformer (promoteurs/séquences codantes Seipin/terminateurs, voir construction des vecteurs partie 3.2.4) et enfin, les cellules compétentes. On incube 30 minutes à 30°C puis 15 minutes à 42°C avant de reprendre les culots dans de l'eau stérile. Les cellules sont étalées sur des boîtes YPD dépourvues d'Uracile et incubées 72h à 30°C. Deux colonies de levures résistantes pour chaque construction sont mises en culture liquide pendant 24h dans du milieu CSM-Ura (MP biomédicals).

##### 3.4.2.1 Sélection des lignées transformées

Afin de sélectionner les lignées, les plasmides sont extraits des levures à l'aide d'un kit commercial (Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep II) en suivant les recommandations du fabricant et sont utilisés pour transformation dans des bactéries compétentes (3.4.1) (NEB® 5-alpha Competent *E.coli* High Efficiency). Les plasmides sont de nouveau extraits par miniprep (NucleoBond Mini Prep, Macherey-Nagel) et soumis à un séquençage Sanger pour vérifier l'assemblage correct des fragments.

### 3.4.3 Transformation de *Phaeodactylum tricornutum* par biolistique

La transformation par biolistique permet l'intégration de matériel génétique dans le génome de *P.tricornutum*. Des cellules maintenues en culture, en milieu liquide, en phase de croissance exponentielle sont utilisées. L'état physiologique sain des cellules est important afin d'augmenter l'efficacité de la transformation. Environ  $10^8$  cellules sont récoltées par centrifugation douce (1000g pendant 15 min) puis sont resuspendues dans 500 $\mu$ L de milieu ESAW 10N10P avant d'être étalées sur une boîte de Pétri contenant du milieu ESAW solide contenant de la carbénicilline. Les cellules sont ainsi maintenues en culture pendant 24h avant la transformation.

La préparation du matériel nécessaire à la transformation par biolistique consiste à revêtir des billes de tungstène avec le plasmide. Un aliquot de 50 $\mu$ L contenant 3mg de billes de tungstène M17 (BioRad, Hercules, USA) diluées dans du glycérol 50% (v/v) est utilisé pour chaque construction. Au moins 4 $\mu$ g de plasmide (idéalement 4 $\mu$ L à 1 $\mu$ g/ $\mu$ L), 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M dilués dans de l'éthanol absolu et 20  $\mu$ L de spermidine à 0.1 M (Sigma-Aldrich) sont déposés sur les billes qui sont activement vortexées pendant 3 minutes. Les billes sont centrifugées quelques secondes, le surnageant est éliminé puis les billes sont rapidement lavées par dépôt et retrait immédiat sans resuspension avec 140 $\mu$ L d'éthanol 70% glacé puis 140 $\mu$ L d'éthanol 100% glacé. Les billes ainsi couvertes d'ADN sont resuspendues dans 50 $\mu$ L d'éthanol 100% puis placées sur un vortex à faible vitesse jusqu'à utilisation.

La transformation par biolistique est réalisée au moyen d'un canon à particules PDS-1000/He (BioRad, USA) que l'on utilise sous hotte en conditions stériles. Les différentes parties du canon et les ustensiles nécessaires à son utilisation sont lavés à l'éthanol 70% pour conserver des conditions axéniques. Les billes de tungstène sont resuspendues précautionneusement puis 10 $\mu$ L sont prélevés et déposés à la surface d'un Macrocarrier (BioRad, Ref #1652335) préalablement fixé sur un support métallique. Un disque de rupture (BioRad, Ref #1652335) d'une résistance de 1550 psi est également fixé sur son support en sortie du canon. Un système de grille maintient le Macrocarrier (billes orientées vers le tapis cellulaire) au-dessus de la boîte de Pétri contenant les algues étalées la veille. L'enceinte est placée sous vide puis de l'hélium est acheminé jusqu'au disque de rupture qui rompt lorsque la pression atteint 1550 psi. Le gaz brusquement libéré projette le Macrocarrier contre une grille qui stoppe ce dernier, mais permet aux billes de tungstène de continuer leur course jusqu'à entrer en contact avec les algues. L'impact libère l'ADN plasmidique des billes qui en endommageant l'ADN génomique des algues l'insère de manière aléatoire. Les cellules transformées sont de nouveau placées en culture (*cf* Matériel et Méthodes, partie 1.2.2) sur des boîtes contenant du milieu ESAW10N10P et de la carbénicilline pendant 48h avant transfert sur milieu sélectif. Pour ce faire, 1 mL de milieu de culture est utilisé pour récolter les cellules et étaler sur une nouvelle boîte contenant l'antibiotique approprié (Zéocine 0,07 $\mu$ M ou Blastidicine 0,028 $\mu$ M).

### 3.4.3.1 Criblage de lignées mutantes Seipin chez *Phaeodactylum tricornutum*

Les lignées de *P.tricornutum* mutantes KO pour la Seipin et mises au point par le laboratoire ont été régulièrement criblées afin de vérifier la présence de la mutation identifiée précédemment ou bien qu'aucune contamination par le WT n'a eu lieu.

Les amorces utilisées pour la réaction de polymérisation en chaîne ont été choisies pour amplifier une large région autour du gène codant Seipin en s'hybridant sur les deux gènes bordants en amont et en aval (Phatr3\_J7649 et Phatr3\_J47297).

Les produits de PCR ont ensuite été séquencés par la méthode de Sanger (réalisé par MacroGen Europe) en utilisant les amorces suivantes.

**Tableau 10 : Liste des amorces utilisées pour amplification de la séquence génomique codant la Seipin et des amorces utilisées pour séquençage Sanger.**

	Nom de l'amorce	Sequence (5'->3')
<i>Amorces utilisées pour amplification</i>	Seip-1F	GGTCTTCCACTTCGGCGTAA
	Seip-1R	TGTCCGAAGAAGCCATGTCC
	Seip-2F	AGTTTACCACCGCCCTTCC
	Seip-2R	GGAGGAGCTTGCTGCTTTTG
	Seip-3F	CGGGTTGATAAAACCACTTGTC
	Seip-3R	TCCAATCTTGCCCCATTACG
<i>Amorces utilisées pour séquençage</i>	Seipine-3Fwd	ACATAACAGTCAGCCGGAGC
	Seipine-3Rev	AGAAGGTAATATTCACTGCCTGTCA
	qPCR PrimerRev4	ACGCATAATTCCTGCACGC

## 4 Analyses physiologiques de *Phaeodactylum tricornutum*

### 4.1 Concentration cellulaire

La concentration cellulaire des cultures liquides est réalisée par lecture de l'absorbance à 730nm (Tecan® MInfinite 1000pro). Une courbe de régression linéaire corrélant l'absorbance à 730nm avec la concentration cellulaire a précédemment été réalisée au laboratoire (Conte *et al.*, 2018). La formule de régression linéaire appliquée est la suivante :

$$y = 1,834 \cdot 10^{-8}x + 0,03758$$

Avec x = concentration cellulaire en million de cellules.mL<sup>-1</sup> et y = absorbance 730nm

Un volume de culture de 300µL est déposé dans une plaque 96 puits à fond transparent (Thermo Fisher Scientific, Référence 142010).



## 5 Méthodes d'études des LDs

### 5.1 Marquage chimique par le rouge de Nil et par le MDH

Plusieurs fluorophores ont été développés pour marquer les LDs. Parmi eux, sont communément utilisés le BODIPY 493/503, le BODIPY 505/515 et le rouge de Nil. Les spectres d'émissions de ces fluorophores se chevauchent partiellement avec celui de la chlorophylle, de la fucoxanthine (pigment majeur de *P.tricornutum*) ou de la protéine fluorescente verte (GFP), ce qui rend leur utilisation dans des modèles photosynthétiques plus difficile. D'autres fluorophores comme le Monodensylpentane (MDH) ou les molécules AC-201, AC-202, AC-1041 sont de plus en plus utilisés dans les organismes photosynthétiques grâce à leur spectre d'émission dans le bleu (410-490nm), rendant compatible leur utilisation avec la fluorescence de la GFP et la chlorophylle.

Dans cette étude, le rouge de Nil (9-diethylamino-5-benzo[ $\alpha$ ]phenoxazinone) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) a été utilisé en routine pour marquer les LDs afin d'en lire la fluorescence sur lecteur de plaques, ou pour observations au microscope. Par la suite, nous avons également utilisé le MDH (AUTODOT™ Visualization Dye, Abcepta, USA) pour marquer les cellules de *P.tricornutum* ou bien de *S.cerevisiae* uniquement pour des observations au microscope. Afin d'optimiser l'utilisation de ce fluorophore très coûteux, des aliquots de la solution commerciale (0,1M dilué dans 100% DMSO) sont dilués au 1/100<sup>e</sup> dans du 100% DMSO. On utilise le fluorophore à une dilution finale au 1/1000<sup>e</sup> dans un petit volume de culture directement prêt à utiliser en microscopie.

#### 5.1.1 Mesures de l'intensité de fluorescence des gouttelettes marquées au rouge de Nil

Le rouge de Nil a principalement été utilisé dans ces travaux pour estimer la quantité de lipides neutres accumulés dans les LDs à travers des mesures d'intensité de fluorescence grâce à un lecteur de plaques (Tecan® MInfinite 1000pro). On prélève 160 $\mu$ L de culture de *P.tricornutum* soit directement dans la culture liquide, soit dilués et normalisés à 10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup>. Ce volume est transféré dans une plaque 96 puits à fond noir (Greiner, ref 655086) sur laquelle la lecture de la fluorescence basale (excitation 530nm, émission 580nm) est relevée. On rajoute 40 $\mu$ L de rouge de Nil que l'on laisse incuber pendant 20 minutes à l'obscurité, et à température ambiante avant une nouvelle lecture de la fluorescence aux mêmes longueurs d'ondes que ci-dessus. La fluorescence basale est retranchée de la fluorescence obtenue après marquage au rouge de Nil et l'intensité est normalisée par la concentration cellulaire (intensité de fluorescence relative par million de cellules).

### 5.1.2 Observation en microscopie à épifluorescence et microscopie confocale

Après lecture de l'intensité de fluorescence des LDs marquées au rouge de Nil, la plaque 96 puits peut être conservée à 4°C à l'abri de la lumière pendant quelques jours, avant observation en microscopie. En revanche, les cellules marquées au MDH sont observées immédiatement. Le montage se fait entre lames et lamelles avec 10µL de cellules marquées au rouge de Nil ou au MDH après avoir resuspendu les cellules sédimentées.

Le microscope à épifluorescence (Zeiss AxioScope A1) équipé d'un objectif x100 à immersion à huile est utilisé pour des observations de routine. La fluorescence du Nile Red est récupérée par un filtre Fluorescein Isothiocyanate (FITC, BP : 485/20 nm, FT : 510 nm, LP : 515 nm, Zeiss Reference : 424931 FilterSet16), la fluorescence du MDH par un filtre DAPI (G : 365nm, FT : 395 nm, BP : 445/50 nm, Zeiss Reference : 424931 FilterSet49) et la fluorescence de la protéine verte par un filtre GFP (BP : 470/40 nm, FT : 495 nm, Zeiss Reference : 424931 FilterSet38).

Les observations de microscopie confocale sont réalisées à l'aide d'un microscope Zeiss LSM800 équipé d'un détecteur Fast AiryScan (Plateforme µLife, BIG, LPCV, Grenoble). L'amélioration de la résolution spatiale est effectuée par le module Airyscan et de la vitesse d'acquisition par l'option Fast. Les échantillons sont excités à 488nm. L'autofluorescence de la chlorophylle ainsi que la fluorescence du rouge de Nil sont respectivement acquises entre 650-700nm et 579-641nm. La fluorescence de la GFP est observée à 500nm après excitation à 400nm. Une acquisition est réalisée tous les 0,15µm en épaisseur selon l'axe z.

Les images au format informatique « .czi » sont traitées par le logiciel libre ImageJ 1.53t version étendue Fiji.

#### 5.1.2.1 Calculs des dimensions et du volume des LDs et des cellules chez *Phaeodactylum tricornutum*

Les images de microscopie confocale permettent des acquisitions de plusieurs plans focaux traversant l'échantillon, selon un axe Z dans un espace de dimension 3 XYZ. La segmentation des gouttelettes et de la cellule de *P.tricornutum* est réalisée manuellement sur le plan focal, que l'on apprécie comme traversant la LD ou la cellule en son milieu. Le diamètre de la gouttelette, la longueur et la largeur de la cellule sont mesurés manuellement par l'outil mesure du logiciel de traitement d'image Fiji adéquat. La gouttelette est assimilée à une sphère dont le volume est calculé par la formule :

$$v_{LD} = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3$$

Avec  $r$  = rayon de la gouttelette en  $\mu\text{m}$  d'où  $v_{LD}$  = volume de la gouttelette en  $\mu\text{m}^3$

Néanmoins, dans certaines cellules mutantes, la forme de la gouttelette n'étant pas totalement assimilable à une sphère, la moyenne de l'axe le plus grand et de l'axe le plus petit est retenu pour le calcul de volume.

La forme géométrique des cellules est assimilée à deux cônes joints par leur base. La formule pour le calcul du volume est la suivante :

$$v_{cell} = 2 * \left( \frac{1}{3} \times \pi \times r^2 \times H \right)$$

Avec  $r$  = rayon mesuré au milieu de la cellule et  $H$  = longueur de la cellule divisée par 2.

L'apparence des cellules de la lignée mutante KO  $\Delta seipin-g8.3$  est, quant à elle, assimilable à une ellipse dont le demi moyen axe (noté  $b$ ) est égal au demi petit axe. Ainsi la formule pour le calcul du volume de cette lignée est la suivante :

$$v_{cell} (\Delta seipin-g8.3) = \frac{4}{3} \times \pi \times a \times b^2$$

Avec  $a$  = longueur de la cellule divisée par 2 et  $b$  = largeur de la cellule divisée par 2.

#### 5.1.2.2 Comptage des gouttelettes chez *Saccharomyces cerevisiae*

Le comptage des LD chez *Saccharomyces cerevisiae* a été réalisé à travers un pipeline bio-informatique mis au point au laboratoire (Chems Amari). Brièvement, les empilements d'images acquises en microscopie confocale (Z stacks) ont été traitées dans un premier temps, à l'aide du logiciel Fiji. Les images composant un stacks ont été réalignées de sorte que les cellules conservent leur position à travers l'empilement (Plugin développé par Chems Amari « Uber Stack Reg », librairie « SciJava Common »). Les LD ont été identifiées en utilisant le Plugin « TrackMate » version 7.11.1 (paramétré sur l'identification d'objets de 5 pixels minimum). Une vérification visuelle est effectuée à cette étape pour s'assurer que les LD ont bien été identifiées et que le seuil de détection est suffisamment haut. Au besoin, cette étape est de nouveau réalisée en modifiant le seuil de détection permettant de s'affranchir du bruit de fond.

La segmentation des cellules a été réalisée selon un modèle entraîné au laboratoire (basé sur l'algorithme Cellpose) (Stringer *et al.*, 2021) en fixant la taille des cellules à  $20\mu\text{m}$ . Une vérification visuelle est également effectuée à cette étape pour s'assurer que toutes les cellules ont bien été identifiées.

Les fichiers correspondant à la segmentation des LD et des cellules ont ensuite été combinées, et chaque LD associée à la cellule dans laquelle elle se trouve, par un script Python. La taille des LD est mesurée selon les trois dimensions par la formule suivante :

$$Taille = A \left[ e^{-\frac{(x^2+y^2)}{2*\sigma^2_{xy}}} + e^{-\frac{z^2}{2*\sigma^2_z}} \right] + B$$

Avec A = amplitude de la gaussienne ; B = constante correspondant au signal fluo du cytosol de la cellule ; r = rayon ; x - y et z = position de la LD dans le stack selon les axes xyz ;  $\sigma_{xy}$  = rayon de la gaussienne dans le plan ;  $\sigma_z$  = rayon de la gaussienne dans l'axe vertical.

## 5.2 Purification des LDs chez *Phaeodactylum tricornutum*

La purification des LDs est réalisée à partir de larges volumes de cultures (2 litres) en se basant sur un protocole déjà établi au laboratoire, et utilisé pour la publication du protéome et du lipidome de la LD chez la souche sauvage en carence d'azote (Lupette *et al.*, 2019). Dans nos expérimentations, les algues sont cultivées comme décrit précédemment (*cf.* Matériel et Méthodes, parties 1.2.3.1 et 1.2.3.2). Le volume total de culture (2L) est réparti dans 2 Erlenmeyer de capacité totale 5L pour la condition de carence en azote. Concernant la condition de stress lumineux, le volume total de culture est divisé dans 29 Erlenmeyer de 250mL (70mL par erlenmeyer). Le ratio 1/5 (évoqué dans la partie 1.2.3) n'a pas pu être respecté ici, pour des raisons techniques de disponibilité de verrerie. Nous avons choisi de diviser ces cultures en plusieurs flasques, plutôt que de rester dans des volumes importants de 1L afin d'imposer effectivement le stress lumineux. Les purifications sont réalisées pour chaque condition en trois expérimentations indépendantes impliquant chacune la souche sauvage et la lignée KO Seipin  $\Delta seipin1.3$  (voir **Tableau 13**).

Les cellules sont récoltées par centrifugation à 6000g, 20 minutes, 4°C (Rotor JLA 10, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), puis les culots sont resuspendus et lavés dans un buffer salin (10mM Tris-HCl+2% NaCl). Une nouvelle centrifugation à 6000g, 20 minutes, 4°C permet d'éliminer le surnageant et de resuspendre les cellules dans 50 mL de tampon sucrose (1 mM d'EDTA ; 0,25 M de saccharose ; Tris-HCl 10 mM pH 7,6; une pastille d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmplete, Roche Diagnostics)). Un système de lyse cellulaire imposant le passage mécanique sous forte pression (2 kbar) à travers un capillaire permet de lyser les cellules (Constant Systems Limited, Daventry, Royaume-Uni). Le lysat cellulaire est centrifugé à 48000 g (Rotor JA20, Beckman CoulterTM, Brea, CA, USA) pendant 20 minutes à 4°C dans des tubes SS34 (Beckman CoulterTM, Brea, CA, USA) pour éliminer les plus gros débris cellulaires. Après cette centrifugation, on relève un culot dense correspondant aux débris cellulaires et un culot d'apparence claire et huileuse fixé à mi-hauteur sur

la paroi du tube. Ce dernier est décollé à l'aide d'une ose stérile et délicatement pipeté jusqu'à un volume maximal de 12mL.

L'étape finale de la purification des LD est réalisée par une purification sur gradient de sucrose avec chargement de l'échantillon par le fond du tube. On ajuste le volume récolté précédemment à une concentration de 1,25M de sucrose en prenant en compte l'augmentation de volume provoqué par la dilution du sucrose. L'échantillon ainsi ajusté est déposé (4mL) au fond d'un tube d'ultracentrifugation (UltraClear sw32ti.1, Beckman Coulter, USA) créant la première couche du gradient sucrose. À l'aide d'une pompe péristaltique, on vient déposer la deuxième couche du gradient sucrose très délicatement et en faisant couler le long de la paroi 9,35mL d'une solution sucrose 0,7M (0.7 M sucrose; Triton X-100 0.2% v/v; Tris-HCl 10mM pH 7.6, une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéase). Enfin, 0,7mL composant la couche finale du gradient sucrose (0.25 M sucrose; Tris-HCl 10mM pH 7.6, une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéase) sont déposés par-dessus tout aussi précautionneusement. Les tubes sont parfaitement équilibrés avec la solution sucrose composant la couche finale, puis sont ultracentrifugés sur la nuit (16heures) à 68000g, 4°C (rotor : sw32 Ti, Beckman Coulter, USA). Les LDs sont collectées au sommet du tube au moyen d'une pipette pasteur en verre et transférées dans des microtubes 1.5mL « Low binding ». Les gouttelettes sont divisées en deux fractions égales destinées aux analyses de lipidomique et de protéomique. La fraction lipidique est cryopréservée dans de l'azote liquide et congelée à -80°C avant extraction par la méthode Bligh & Dyer (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 6.3). Les échantillons protéiques sont traités comme décrit dans la partie 7.1.2.

## 6 Méthodes d'analyses des lipides

### 6.1 *Extraction des lipides à partir des surnageants de culture*

Les surnageants ont été récoltés (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 1.3.1) et conservés à -80°C. Les tubes sont décongelés progressivement au bain-marie (5 minutes à température ambiante) pour que le glaçon puisse se décoller du tube. Il est alors récupéré dans un bécher et 60mL de Chloroforme puis 60mL de Methanol sont rajoutés et laissés pendant 30 minutes jusqu'à ce que tout le surnageant soit décongelés. On transfère dans une ampoule à décanter, et on agite pour homogénéiser. Les échantillons sont laissés à décanter pendant 2h avant de récolter la phase organique inférieure. On met la phase récoltée à évaporer sous argon puis on reprend les lipides avec 3 fois 1mL de Chloroforme en prenant soin de le déverser sur toutes les parois pour récolter tous les lipides. Les échantillons sont transférés dans des tubes en verre à hémolyse. Une étape finale de séchage sous flux d'argon permet de conserver les lipides secs à -20°C.

## 6.2 *Extraction des glycérolipides selon la méthode de Folch*

La méthode de Folch (Folch, Lees and Sloane Stanley, 1957) est utilisée pour l'extraction des glycérolipides à partir d'échantillons biologiques solides (culots d'algues *P.tricornutum* ou de levures *S.cerevisiae*). Les échantillons conservés à -80°C sont lyophilisés (Christ Alpha 2-4 LDplus) sur la nuit avant extraction, afin d'enlever l'eau résiduelle ainsi que pour empêcher l'action de lipases. Les échantillons sont pesés en sortie de lyophilisation pour estimer la masse sèche, puis le culot sec est immédiatement transféré dans des tubes Corex de capacité 35mL baignant dans de l'azote liquide. Les culots sont broyés à l'aide d'un pilon Potter-Elvehjem puis sont dissous dans 4mL d'éthanol 100% bouillant et incubés 5 minutes à 90°C permettant aux enzymes de type lipases d'être totalement inactivées. On ajoute ensuite séquentiellement 2mL de méthanol puis 8mL de chloroforme et l'on fait buller le mélange sous un flux d'argon créant une atmosphère inerte et empêchant l'oxydation des lipides au contact de l'air. Les échantillons sont laissés 1h à température ambiante puis sont filtrés à travers une laine de quartz pour retenir les débris cellulaires. La formation d'une bi-phase est ensuite provoquée par ajout de 3mL de chloroforme/méthanol (2 :1, v/v) puis de 5mL de solution saline NaCl 1%. Les échantillons sont de nouveau soumis à un bullage sous argon pendant 1 minute avant d'être centrifugés 10 minutes à 2000rpm. La phase inférieure organique contenant les lipides est alors récoltée puis séchée sous flux d'argon. Les lipides sont récupérés en lavant les parois trois fois avec du chloroforme puis transférés dans des tubes en verre à hémolyse. Une étape finale de séchage sous flux d'argon permet de conserver les lipides secs à -20°C.

## 6.3 *Extraction des glycérolipides selon la méthode de Bligh & Dyer*

Les glycérolipides composant les LDs purifiées (cf. Matériel et Méthodes, partie 5.2) sont extraits selon la méthode de Bligh & Dyer. Les échantillons sont lyophilisés sur la nuit. On rajoute 1,5mL d'un mélange chloroforme/méthanol (1 :2, v/v) pour resuspendre les échantillons que l'on transfère dans un tube à hémolyse en verre que l'on vortex pour homogénéiser. Puis 500µL de chloroforme sont rajoutés. Le biphasé est créé par l'ajout de 900µL d'eau et 30 secondes de vortex. Les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 3000rpm et la phase inférieure organique est transférée dans un nouveau tube à hémolyse qui est séché sous argon. Les lipides sont stockés à -20°C avant analyses.

## 6.4 *Méthanolyse des acides gras*

La réaction chimique de méthanolyse est une transestérification nucléophile au cours de laquelle les acides gras composant un glycérolipide sont décrochés du squelette glycérol puis estérifiés sur du méthanol pour former des esters méthyliques d'acides gras (FAME). Les FAME sont détectés et dosés (cf. Matériel et Méthodes, partie 6.5.1) et permettent d'estimer la quantité totale de lipides composant un échantillon.

Les lipides secs conservés à -20°C sont resuspendus dans 1mL de chloroforme. La méthanolyse est réalisée selon le protocole suivant au moyen d'un robot permettant d'automatiser le procédé. Un volume de 50µL y est prélevé et 5µg d'un acide gras à 15 carbones (C15 :0n Sigma Alrich) servant de standard interne sont ajoutés. La réaction de méthanolyse se fait par ajout de 3mL de méthanol:acide sulfurique (40 :1, v/v) puis incubation à 100°C pendant une heure. Les tubes sont refroidis pendant 5 minutes à température ambiante avant d'ajouter 3mL d'eau pour stopper la réaction. Les FAME étant hydrophobes, ils sont récupérés par ajout de 3mL d'hexane et une double phase se forme dans les minutes qui suivent un vortex intense. La phase organique supérieure est récoltée et est séchée sous flux d'argon avant stockage à -20°C.

## 6.5 Quantification des acides gras totaux et des glycérolipides

### 6.5.1 Dosage des acides gras par GC-FID

Les FAME conservés à -20°C sont resuspendus dans 50µL d'hexane puis analysés par chromatographie en phase gazeuse, couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) (Perkin Elmer Clarus 580). Les FAME sont séparés le long d'une colonne de cyanopropyl polysilphenesiloxane de 30m de long, diamètre interne de 0,22 mm, épaisseur de film de 0,25 µm (SGE BPX70) chauffée à une température croissante de 130 à 180°C. L'azote est utilisé comme gaz vecteur. Les FAME sont identifiés par leur temps de rétention, qui dépend de leur nombre de carbones et d'insaturations, grâce à des standards externes. Ils sont ensuite quantifiés par l'intégration de leur pic de détection et par comparaison avec le pic de standard interne C15 :0 introduit durant la méthanolyse et dont la quantité est connue. La quantité de lipides totale extraite dans les échantillons est ainsi quantifiée. Ces calculs sont réalisés grâce à un logiciel développé par Sylvaine Roy au laboratoire.

### 6.5.2 Dosage des glycérolipides par LC-MS/MS

Le dosage des glycérolipides est réalisé sur la plateforme d'analyses des lipides (LIPANG, LPCV, Grenoble) dirigée par Juliette Jouhet. Les échantillons sont séparés par chromatographie en phase liquide (LC), détectés et quantifiés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

À partir des échantillons de lipides conservés à -20°C, un volume correspondant à 25nmol (déterminé par GD-FID) est prélevé et dilué dans 100µL de chloroforme :méthanol (2 :1, v/v) dans lequel différents standards internes sont ajoutés : le DAG 18:0-22:6 (Avanti Polar Lipid, Alabaster, USA), la PE 18:0-18:0 (Avanti Polar Lipid, Alabaster, USA) et le SQDG 16:0-18:0, extrait des thylakoïdes d'épinard (Demé *et al.*, 2014) et hydrogéné comme décrit par (Buseman *et al.*, 2006). Les lipides ont ensuite été séparés par HPLC et quantifiés par MS/MS. La méthode de séparation par HPLC a été adaptée précédemment (Rainteau *et al.*, 2012). Les classes de lipides sont séparées en utilisant un système HPLC Agilent 1200 couplé à une colonne de diol 5 µm de 150 mm x 3 mm (longueur x

diamètre interne) (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) à 40°C. Les phases mobiles sont constituées d'hexane/isopropanol/eau/acétate d'ammonium 1 M, pH 5,3 [625/350/24/1, (v/v/v/v)] (A) et d'isopropanol/eau/acétate d'ammonium 1 M, pH 5,3 [850/149/1, (v/v/v)] (B). Le volume d'injection est de 20 µL. Après 5 minutes, le pourcentage de B est augmenté linéairement de 0% à 100% en 30 minutes et est maintenu à 100% pendant 15 minutes. Cette séquence d'élution est suivie d'un retour à 100% de A en 5 minutes et d'un équilibrage de 20 minutes avec 100% de A avant la prochaine injection, conduisant à une durée totale de fonctionnement de 70 minutes. Le débit de la phase mobile est de 200 µL min<sup>-1</sup>. Les différentes classes de glycérolipides sont éluées successivement en fonction de leurs têtes polaires. L'analyse par spectrométrie de masse est réalisée sur un spectromètre de masse de type triple quadrupole 6460 (Agilent, Santa Clara, USA) équipé d'une source d'ions electrospray de type Jetstream (gaz utilisé : azote) dans les conditions suivantes : température du gaz de séchage, 260°C ; flux du gaz de séchage, 13 L.min<sup>-1</sup> ; température du gaz d'enveloppe, 300°C ; flux du gaz d'enveloppe, 11 L.min<sup>-1</sup> ; pression du nébuliseur, 25 psi ; tension capillaire, ± 5000 V ; tension de buse, ± 1000 V. L'azote est utilisé comme gaz de collision. Les quadrupôles Q1 et Q3 sont exploités pour la résolution la plus large et la résolution unitaire respectivement. Les analyses de la PC et du DGTA ont été effectuées en mode d'ions positifs en recherchant des précurseurs de m/z 184, 236 et aux énergies de collision (CE) de 34 eV et 52 eV respectivement. L'analyse du SQDG est réalisée en mode ion négatif par balayage des précurseurs de m/z -225 à CE de -56 eV. Les mesures des PE, PI, PG, MGDG et DGDG sont effectuées en mode ions positifs en recherchant des pertes de neutres de 141 Da, 277 Da, 189 Da, 179 Da et 341 Da aux CE de 20 eV, 12 eV, 16 eV, 8 eV et 8 eV, respectivement. La quantification est effectuée en utilisant un suivi de réaction multiple (MRM – Multiple Reaction Mode) avec un temps de séjour de 40 ms. Les spectres de masse ont été traités par le logiciel MassHunter Workstation (Agilent, Santa Clara, USA) pour l'identification et la quantification des lipides. Les quantités de lipides (pmol) sont corrigées pour les différences de réponse entre les standards internes et les lipides endogènes, et par comparaison avec un contrôle qualité (QC). L'extrait du QC correspond à un extrait de lipides de *Phaeodactylum* qualifié et quantifié par chromatographie sur couche mince et GC-FID (Jouhet *et al.*, 2017).

## 7 Méthodes d'analyses des protéines

### 7.1 Extraction de protéines

#### 7.1.1 Extraction de protéines totales de *Phaeodactylum tricornutum*

Les culots cellulaires de *P.tricornutum* conservés à -80°C sont lyophilisés (Christ Alpha 2-4 LDplus) sur la nuit afin d'augmenter le rendement d'extraction. Les culots secs sont repris dans un volume total de 700µL de tampon « TANAKA » (sucrose 0.7 M, Tris 0.5 M, HCl 30 mM, EDTA 50 mM, KCl 0.1 M,



PMSF 2 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 2 mM, une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéase) et sont vortexés pendant 1 minute. On ajoute 750 $\mu$ L de phénol et on vortex 1 minute avant de centrifuger (20 000g, 5 minutes, 4°C). On récupère environ 500 $\mu$ L de la phase supérieure pigmentée contenant les protéines en faisant attention à ne pas contaminer par l'interface entre les deux phases. Les protéines sont précipitées à -20°C sur la nuit par de l'acétate d'ammonium 0,1M / méthanol glacé (-20°C). Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 20 000g, 30 minutes, 4°C puis les culots sont lavés trois fois avec 1mL d'acétate d'ammonium 0,1 M/méthanol glacé afin d'éliminer toute trace de pigments. Un autre lavage rapide par de l'acétone 100% glacé est réalisé. Les tubes sont laissés ouverts pour sécher sous hotte pendant 30 minutes puis repris dans un tampon de lyse (8 M urée, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8) dans lequel on rajoute 5%  $\beta$ -mercaptoethanol au moment de son utilisation. La quantité de protéines purifiées est mesurée par dosage Bradford (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 7.3.1) après avoir laissé reposer les échantillons pendant 2h à température ambiante.

#### 7.1.2 Extraction des protéines à partir des LDs purifiées

Un volume d'1 mL d'acétone froid est ajouté dans la fraction protéique pour précipiter les protéines. Les fractions sont placées à -20°C pendant une nuit. Les tubes sont ensuite centrifugés à 20000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et les culots sont repris dans un volume d'un millilitre d'acétate d'éthyle froid, pour éliminer les dernières traces d'huile, pendant 2 heures à -20°C. Les fractions sont de nouveau centrifugées à 20000 rpm à 0°C pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé, les culots protéiques sont séchés sous hotte avant d'être resuspendus dans 50 $\mu$ L de tampon Laemmli (Bolt LDS Sample Buffer, Life Technologies, USA) auquel on ajoute un tampon réducteur (Bolt, Sample Reducing Agent, LifeTechnologies, USA). Les échantillons sont chauffés 10 minutes à 95°C avant congélation à -20°C.

#### 7.1.3 Extraction de protéines totales de *Saccharomyces cerevisiae*

Les culots de levures conservés à -80°C dans des tubes PreCellys (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 2.4) sont resuspendus dans 200 $\mu$ L de tampon protéines (Tris 50mM, Urée 8M, EDTA 1mM, pH 6,8). Une spatule de billes de silice de diamètre 0,5mm (Glass beads, acid-washed, 425-600 $\mu$ m, Sigma, USA) y est ajoutée. Les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 70°C dans un bain sec sous agitation (500rpm). Le système de lyse cellulaire (PreCellys 24 Touch, Bertin Technologies, France) est utilisé sur 3 cycles de 20 secondes à 10 000rpm pour lyser les cellules. Les étapes de chauffe et de lyse sont réalisées une seconde fois. On centrifuge à 5000g, 5 minutes, 4°C et le surnageant est transféré dans un microtube (Eppendorf 1,5mL). Les protéines sont directement dosées par dosage Bradford (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 7.3.1).

## 7.2 Expression *in vitro* de PtSeipin

Les tests d'optimisation de production de la protéine Seipin à partir du vecteur pIVEX-Seipin (cf. Matériel et Méthodes, partie 3.2.2) ont été supervisés par Lionel Imbert sur la plateforme Cell Free de l'ISBG (Integrated Structural Biologie, Grenoble) à l'Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble. Le système permet la production d'une protéine d'intérêt à travers une machinerie de transcription/traduction. Des conditions exemptes de toute RNase sont essentielles pour ne pas dégrader les produits de transcription. Brièvement, le système exploité met en jeu deux chambres séparées par une membrane semi perméable (système de dialyse). Un mix réactionnel comprenant les molécules nécessaires à la transcription/traduction (T7 RNA polymérase, ARNs de transfert, Créatine kinase, vecteur d'expression) est introduit dans la première chambre tandis qu'un mix permettant d'alimenter le système en énergie (sous forme d'ATP), en nucléotides (CTP, GTP, UTP) et en acides aminés est introduit dans la deuxième chambre. Dans les deux chambres, un détergent Brij 58 (20% CMC50) est rajouté. Le système est incubé pendant une nuit à 25°C avant purification de la protéine produite.

### 7.2.1 Purification de PtSeipin exprimées en système *in vitro*

La protéine produite en système *in vitro* possède un tag histidine permettant sa purification sur colonne de nickel. Après centrifugation (14000g, 20 minutes, 4°C), le surnageant contenant la protéine solubilisée est dilué dans une solution tampon A (Tris 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, imidazole 15 mM, DDM 5 Concentration Micellaire Critique (CMC)). Les échantillons sont chargés sur une colonne de Nickel préalablement lavée et saturée par le tampon A. Après un premier passage, l'échantillon est de nouveau chargé sur la colonne pour fixer le maximum de protéines. La colonne est lavée par une solution tampon B (Tris 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, imidazole 30 mM, DDM 5 CMC) pour éliminer des contaminants résiduels. Enfin, les protéines sont éluées en plusieurs fractions par une solution tampon C (Tris 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, imidazole 300 mM, DDM 5 CMC). Les fractions d'élutions sont aliquotées en volumes de 50µL et conservées à -80°C.

## 7.3 Dosage des protéines

### 7.3.1 Dosage par la méthode de Bradford

La méthode de dosage de protéines Bradford (Bradford, 1976) est un dosage colorimétrique basé sur la capacité de fixation aux protéines d'un colorant (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) et sur le changement d'absorbance induit par cette fixation (mesuré à 595nm). L'absorbance des échantillons est rapportée à une gamme étalon établie grâce à des fractions d'albumine bovine (BSA, « Bovine Serum Albumin ») de concentrations connues, de 0 à 10 µg/mL. Le colorant utilisé est dilué 5 fois et réparti dans des cuves spectrophotométriques contenant 1 mL. Entre 1 et 5µL d'échantillon

y sont dilués, homogénéisés par vortex et incubés à température ambiante pendant 5 minutes avant lecture de l'absorbance à 595 nm (Eppendorf Biophotometer D30).

### 7.3.2 Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent de protéines préalablement migrées sur gel de polyacrylamide (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 7.4.1) a été utilisée pour estimer les concentrations relatives des échantillons protéiques obtenus à partir des LDs purifiées (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 5.2). En effet, selon les recommandations de la plateforme d'analyse des protéines (EDyP, IRIG, CEA, Grenoble), les échantillons dilués dans un tampon Laemmli coloré au bleu ne peuvent pas être dosés par Bradford.

La coloration au nitrate d'argent est réalisée avec le kit commercial SilverQuest™ staining (Invitrogen, Carlsbad, USA) en suivant les indications du fabricant. Par comparaison avec une quantité de protéines connue, les volumes suivants (**Tableau 11**) ont été retenus pour analyses protéomiques.

**Tableau 11 : Tableau récapitulatif des volumes de protéines soumis aux analyses protéomiques estimés par coloration au nitrate d'argent.** Les volumes d'échantillons indiqués entre parenthèses et en italique ont été utilisés pour une analyse protéomique permettant une profondeur d'analyse importante grâce à une quantité de protéines supérieure par rapport à l'analyse globale impliquant tous les échantillons.

Condition de culture	Label manip	Lignée	Nom	Volume initial de reprise culot de proteines (µL)	Volume colorés nitrate argent (µL)	Volumes d'échantillons utilisés pour la protéomique (µL)
Carence en Azote	A	WT	LD1	50	3	5,5 (15)
		<i>Δseipin-g1.3</i>	LD2	50	3	3,8 (10,4)
	B	WT	LD3	50	3	3,3 (9)
		<i>Δseipin-g1.3</i>	LD4	50	3	2,2 (6)
	C	WT	LD5	50	2	3,8 (10,4)
		<i>Δseipin-g1.3</i>	LD6	50	2	4,3 (11,7)
Forte lumière	E	WT	LD7	50	6	30
		<i>Δseipin-g1.3</i>	LD8	50	2	8,5
	F	WT	LD9	50	6	25
		<i>Δseipin-g1.3</i>	LD10	50	2	10
	G	WT	LD11	50	12	20
		<i>Δseipin-g1.3</i>	LD12	50	4	7

## 7.4 Immunodétection des protéines

### 7.4.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-Page)

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide en fonction de leur masse moléculaire uniquement en utilisant un agent dénaturant sodium dodecyl sulfate (SDS). Un volume d'échantillon entre 1 et 15µL est mélangé à un tampon dénaturant (LDS (4X) NuPAGE™, Life technologies) ainsi qu'à un agent de réduction (Sample reducing agent (10X) NuPAGE™, Life technologies). Le mélange est chauffé à 95°C pendant 5 minutes. Pour les échantillons protéiques purifiés à partir des LDs, ces étapes ont déjà été réalisées lors de la reprise des échantillons (*cf.* Matériel et Méthodes, partie 5.2).

Les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide (NuPAGE™ 4 à 12 % Bis-Tris minigel, Life Technologies) et la migration est effectuée dans une cuve Mini Gel Tank (Life Technologies) à 100V pendant 10 minutes puis 120V pendant environ 1h30, jusqu'à ce que le marqueur visuel ait migré en bas du gel.

### 7.4.2 Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines depuis un gel de polyacrylamide est réalisé sur membrane de nitrocellulose (Amersham Protran 0.2 µm) afin de réaliser des immunomarquages. Un « sandwich » comportant du papier absorbant (papier Whatman) et une membrane de nitrocellulose découpés aux mêmes dimensions que le gel, est réalisé et placé dans une cuve d'électrophorèse Mini Gel Tank (Life Technologies). On prend soin de positionner le gel au pôle chargé négativement, et la membrane de nitrocellulose au pôle chargé positivement, afin de permettre la migration des protéines chargées négativement depuis le gel vers la membrane. La migration s'effectue dans un tampon de transfert (Laemmli 1X : Glycine 192 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.3 contenant 10% d'éthanol) à 90V pendant 1h30. Après transfert, la membrane est rincée dans de l'eau distillée puis incubée 2 minutes dans du rouge ponceau (rouge ponceau 0,2% (p/v), TCA 3% (v/v)) afin de vérifier le transfert correct des protéines sur la membrane. Par la suite, la membrane est lavée dans une solution tampon Tris salin (TBS; Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH7.6).

### 7.4.3 Immunomarquage des protéines

L'immunomarquage est réalisé afin de détecter des protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose (voir ci-dessus). La membrane est incubée à température ambiante sous agitation au moins 2 heures dans une solution tampon TBS-lait 5% (p/v). Cette étape permet de saturer la membrane en protéines en bloquant toutes les positions qui ne l'étaient pas, après transfert des protéines depuis le gel. Les anticorps primaires reconnaissant le peptide souhaité par leur partie variable sont placés sur la membrane à des dilutions (dans TBS1X, 0.5% lait, Tween 0.1%) dépendant

de l'anticorps utilisé (**Tableau 12**) sur la nuit à 4°C sous agitation. La membrane est de nouveau lavée dans une solution tampon TBS 1X avant incubation par les anticorps secondaires, dont la partie variable se fixe à la partie constante de l'anticorps primaire. L'incubation avec l'anticorps secondaire se fait pendant 3 heures à température ambiante sous agitation. La membrane est lavée trois fois dans une solution tampon TBS et la révélation se fait par détection de l'activité de la peroxydase de raifort couplée aux anticorps. Cette enzyme catalyse l'oxydation du luminol présent dans les solutions commerciales Clarity™ et Clarity Max Western ECL (BioRad, USA) utilisées suivant les recommandations du fabricant. La luminescence produite par l'oxydation du luminol est révélée à 428nm (Amersham ImageQuant 800).

**Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés dans les différentes expérimentations conduites dans cette thèse.**

<b>Cible</b>	<b>Poids moléculaire(kDa)</b>	<b>Compartiment cellulaire</b>	<b>Ref</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution</b>	<b>Anticorps secondaire</b>	<b>Dilution</b>
<b>CGI58</b>	55,5	Mitochondrie	Lupette <i>et al.</i> , 2018	Ac à façon (Biotem)	1/1000	Lapin	1/10000
<b>CNX</b>	47	Reticulum endoplasmique	Lupette <i>et al.</i> , 2018	Ac à façon (Biotem)	1/5000	Lapin	1/10000
<b>COP1</b>	32	Reticulum endoplasmique	Lupette <i>et al.</i> , 2018	Ac à façon (Biotem)	1/1000	Lapin	1/10000
<b>Psac</b>	9	Plaste, Thylakoïdes	Du <i>et al.</i> , 2018	ref AS10 939 (Agrisera)	1/1000	Lapin	1/10000
<b>PsbA</b>	28-30	Plaste, Thylakoïdes	Du <i>et al.</i> , 2018	ref AS05 084 (Agrisera)	1/1000	Lapin	1/10000
<b>ACL1</b>	73,5	Peroxisome	Lupette <i>et al.</i> , 2018	Ac à façon (Biotem)	1/1000	Lapin	1/10000
<b>Seipin</b>	48	Reticulum endoplasmique	Lupette <i>et al.</i> , 2018	Ac à façon (Biotem)	1/1000	Lapin	1/10000
<b>TPT3</b>	36	Enveloppe Plaste	Lupette <i>et al.</i> , 2018	Ac à façon (Biotem)	1/1000	Lapin	1/10000
<b>StLDP</b>	49	LD	Lupette <i>et al.</i> , 2018	Ac à façon (Biotem)	1/1000	Lapin	1/10000
<b>RAE</b>	38	Enveloppe nucléaire	Lupette <i>et al.</i> , 2018	Ac à façon (Biotem)	1/1000	Lapin	1/10000
<b>GFP</b>	Poids protéine intérêt + 27kDa	-	-	Ref 130-091-833 Miltenei (Biotech)	1/5000	-	-
<b>Tag Histidine</b>	Variable	-	-	Ref 46.0693 (Thermofisher)	1/5000	Souris	1/5000

## 8 Récapitulatif des lignées de *Phaeodactylum tricornutum* Knock-Out Seipin utilisées

Les lignées mutants Knock-Out (KO) pour la protéine Seipin utilisées dans les expérimentations ont été préalablement établies par le laboratoire d'accueil. Le système CRISPR-Cas9 a été utilisé avec l'expression d'ARN guides ciblant le gène *Seipin* identifié par (Lu *et al.*, 2017). Des ARN guides ciblant des positions en amont de la région codant le premier domaine transmembranaire ont été retenus. Un unique vecteur contenant les séquences codantes de l'ARN guide, de l'enzyme Cas9, ainsi que d'un gène de résistance à l'antibiotique zéocine a été intégré dans le génome de *Phaeodactylum tricornutum* suite à une transformation par biolistique. Après sélection positive des colonies transformées sur milieu sélectif, plusieurs étapes de purification successives ont été nécessaires. Les mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN après coupure double brin par l'enzyme Cas9 peuvent intervenir à différents temps, dans des cellules filles issues de la division d'une même cellule mère, elle-même issue d'un évènement unique d'intégration génétique suite à la transformation par biolistique. Ainsi, plusieurs générations cellulaires sont parfois nécessaires avant qu'une mutation ne soit introduite. Cela peut aboutir à une colonie qualifiée de mosaïque c'est-à-dire une colonie composée d'individus, soit sauvages (WT), soit présentant différentes mutations résultant d'erreurs de réparations indépendantes. Les cellules sont isolées par étalements successifs en milieu solide. À chaque étape, les colonies sont génétiquement criblées par amplification de l'acide nucléique et les produits d'amplification séquencés par la méthode de Sanger (Macrogen, Europe). Les résultats de séquençages sont soumis à des outils informatiques (TIDE, Brinkman *et al.*, 2014) permettant d'évaluer le pourcentage de chaque mutation. Ces étapes sont répétées jusqu'à obtention de colonies pures pour une mutation, à l'exception de  $\Delta seipin1.2$  et  $\Delta seipin8.3$  qui présentent un mélange de deux mutations (voir **Tableau 13**).

Le **Tableau 13** récapitule l'ensemble des clones disponibles lors de mon arrivée au laboratoire et utilisés au cours des différentes expérimentations.

**Tableau 13 : Tableau récapitulatif des différentes lignées KO Seipin utilisées dans les expérimentations.**

Lignée	ARN guide utilisé	Nom de la lignée purifiée	Mutation identifiée	Longueur du peptide traduit (#acides aminés)
WT	-	WT	-	436
$\Delta seipin1.1$		1.1.5.4	Large délétion de 884 nucléotides	N/A
$\Delta seipin1.2$	1	1.2.1.5.7	Mélange de deux larges délétions de 300 et 225 nucléotides	37
$\Delta seipin1.3$		1.12.12	Insertion de deux nucléotides	41

<i>Δseipin8.1</i>		8.8.6	Insertion d'un nucléotide	68
<i>Δseipin8.2</i>	8	8.15.20	Insertion de cinq nucléotides	66
<i>Δseipin8.3</i>		8.16.5.16	Mélange entre Insertion 1 nucléotide et délétion 2 nucléotides	63 68



## Annexe

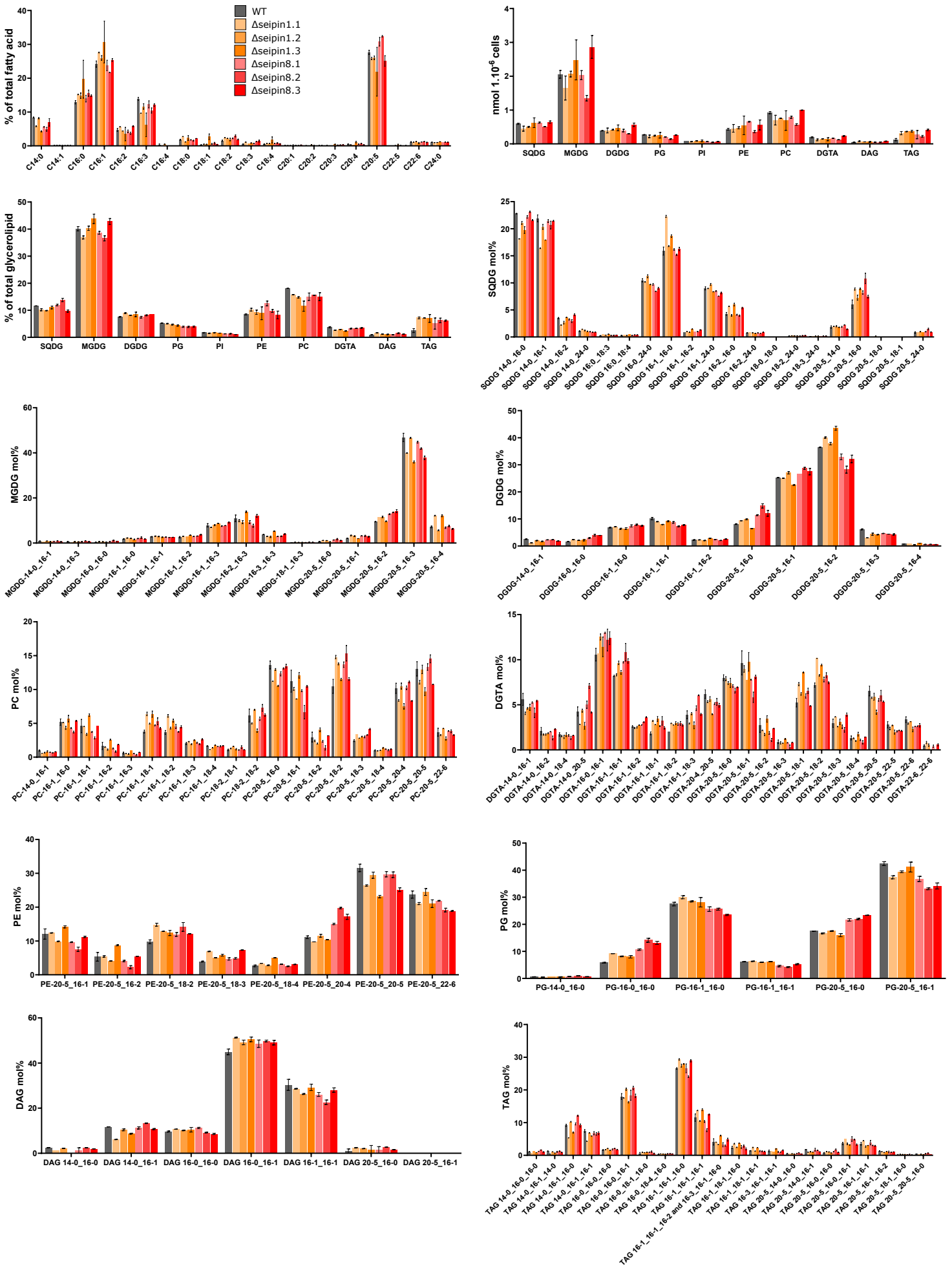
Figures Supplémentaires : Profils totaux des acides gras (% du total), des glycérolipides (en nmol par million de cellules ou en % des glycérolipides totaux) et profils relatifs des différentes espèces composant chaque glycérolipide (SQDG, MGDG, DGDG, PC, DGTA, PE, PG, DAG, TAG) en mol%. n = 2, les barres d'erreurs représentent chaque réplicats.

Figure Supp 1 : Jour 8 condition de culture normale.

Figure Supp 2 : Jour 8 condition de culture forte lumière.

Figure Supp 3 : Jour 8 carence en phosphate.

Figure Supp 1



**Figure Supp 2**

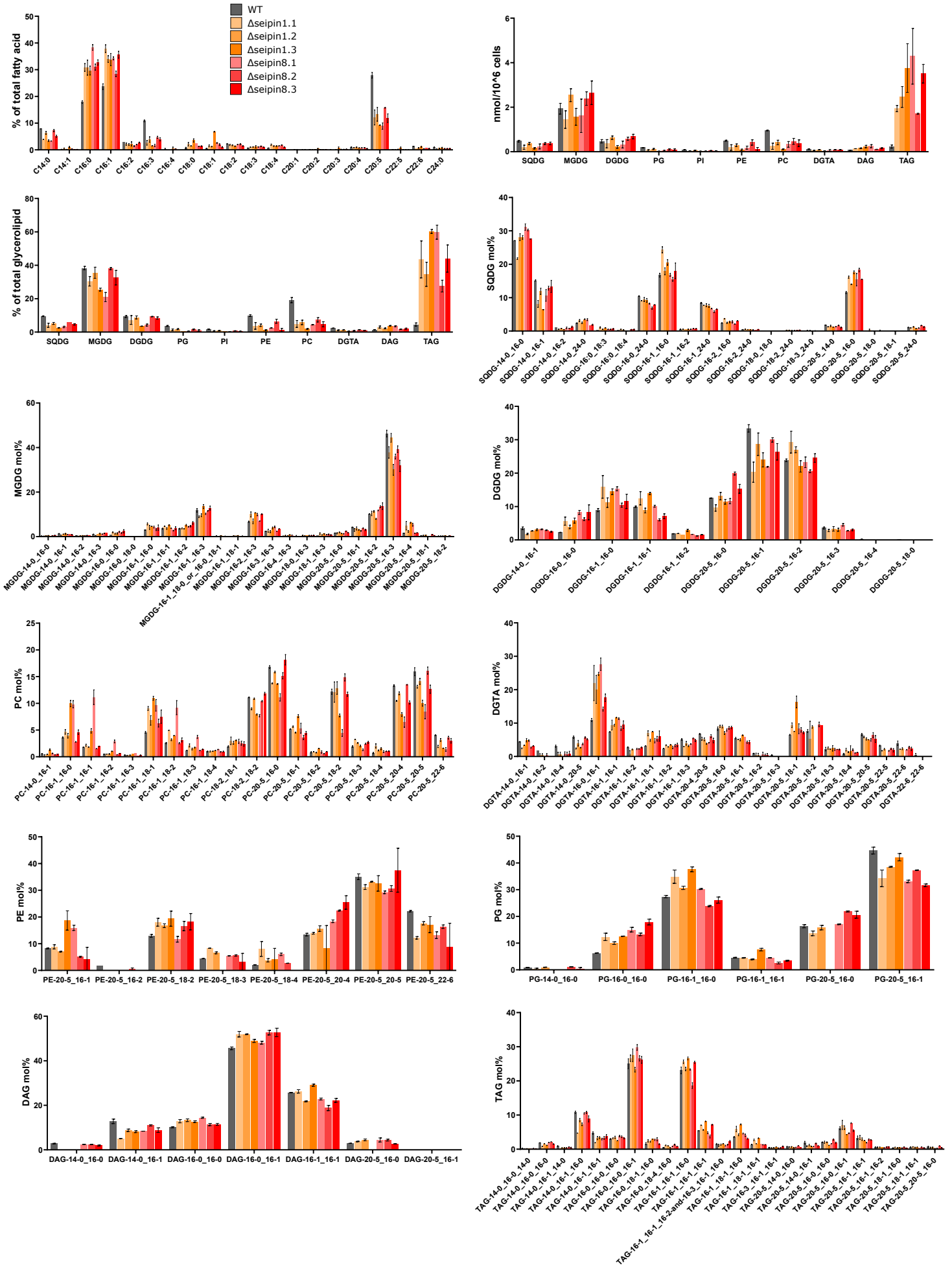
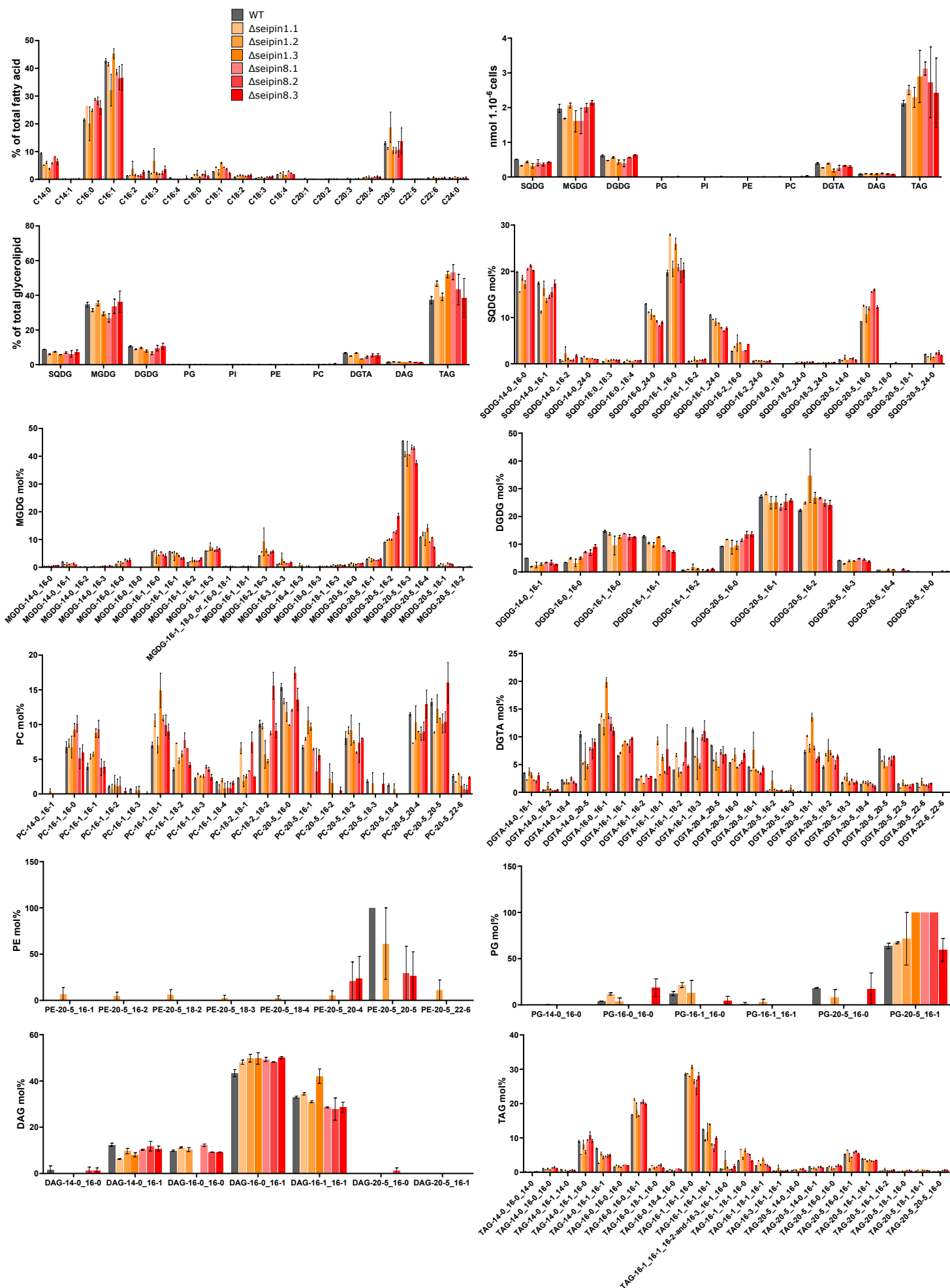


Figure Supp 3





## Liste de participations à des congrès et communications orales

Orateur dans des congrès internes et internationaux :

- **Structural and functional study of oil droplet in diatoms - optimization of oil productivity and extractability.** Présentation annuelle interne CEA – programme FOCUS n°1 – 15 mars 2021
- **Oil Droplet in microalgae - functional study of Seipin.** *Young Scientists Event Lipid Droplets* Online Event, 2021, March 29.
- **Functional study of Seipin protein in a microalgae.** *Lipid droplets and oleosomes conference.* Strasbourg (France), 2021, December 2-3
- **Structural and functional study of oil droplet in diatoms - optimization of oil productivity and extractability.** Présentation annuelle interne CEA – programme FOCUS n°2 – 29 mars 2022
- **Targeted and unsupervised lipidomics analysis in mutants microalgae.** *GRAL's symposium on research infrastructures in structural & cell biology.* Grenoble (France), 2022, May 12
- **Functional study of Seipin protein in *Phaeodactylum tricornutum*.** *25th International Symposium on Plants Lipids.* Grenoble (France), 2022, July 11-15
- **Etude fonctionnelle de la protéine Seipin chez la microalgue *Phaeodactylum tricornutum*.** Communication interne CEA - Présentation au comité FOCUS – 23 Septembre 2022
- **Lipid Droplet formation in the microalga *Phaeodactylum tricornutum* and role of Seipin.** Communication interne au laboratoire – LPCV, 23 mars 2023
- **Characterization of Lipid Droplet Seipin protein in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.** *Lipid droplets and oleosomes conference.* Wageningen (The Netherlands), 2023, May 22-23

Présentation de Posters dans des congrès scientifiques internationaux :

- ***Oil Droplet in microalgae - functional study of Seipin***, Online, 2021, July 26-27, International solar fuel Young version - Damien Le Moigne, Fabien Richard, Matteo Arrighi, Mégane Mahieu, Catherine Albrieux, Gregory Si Larbi, Valérie Gros, Juliette Jouhet, Eric Maréchal, Juliette Salvaing
- ***Functional study of microalgae Seipin protein in Lipid Droplets formation***, 2021, September 26-29, GERLI conference - Damien Le Moigne, Fabien Richard, Matteo Arrighi, Mégane Mahieu, Catherine Albrieux, Gregory Si Larbi, Valérie Gros, Juliette Jouhet, Eric Maréchal, Juliette Salvaing
- ***Lipid Droplet protein Seipin in microalgae *Phaeodactylum tricornutum****, 2023, January 28-29, Gordon Research Seminary (GRS) – Galveston, Texas, USA - <sup>1</sup>Damien Le Moigne, <sup>1</sup>Fabien Richard, <sup>1</sup>Mégane Mahieu, <sup>1</sup>Matteo Arrighi, <sup>1</sup>Catherine Albrieux, <sup>1</sup>Valérie Gros, <sup>1</sup>Mathilde Louwagie, <sup>1</sup>Gregory Si Larbi, <sup>1</sup>Juliette Jouhet, <sup>1</sup>Olivier Bastien, <sup>1</sup>Alberto Amato, <sup>1</sup>Éric Maréchal and <sup>1</sup>Juliette Salvaing.
- ***Lipid Droplet protein Seipin in microalgae *Phaeodactylum tricornutum****, 2023, January 30-31, February 1-2, Gordon Research Conference (GRC) – Galveston, Texas, USA - <sup>1</sup>Damien Le Moigne, <sup>1</sup>Fabien Richard, <sup>1</sup>Mégane Mahieu, <sup>1</sup>Matteo Arrighi, <sup>1</sup>Catherine Albrieux, <sup>1</sup>Valérie Gros, <sup>1</sup>Mathilde Louwagie, <sup>1</sup>Gregory Si Larbi, <sup>1</sup>Juliette Jouhet, <sup>1</sup>Olivier Bastien, <sup>1</sup>Alberto Amato, <sup>1</sup>Éric Maréchal and <sup>1</sup>Juliette Salvaing.

Interaction avec le grand public :

- **Les microalgues : un monde invisiblement riche**, Fête de la science. 2021, 9 octobre.  
Stéphanie Bolik, Marlene Bonnanfant, **Damien Le Moigne**, Benjamin Fel, Fabien Richard

Participation en tant que comité d'organisation de meeting et de conférences internationales :

- **International Solar Fuels conference (young version)**, Online event, 2021, July 26-27.  
Chairman of a session

## Liste de productions scientifiques :

Articles de revue :

- Nolwenn Guéguen, **Damien Le Moigne**, Alberto Amato, Juliette Salvaing, et Eric Maréchal.  
« Lipid Droplets in Unicellular Photosynthetic Stramenopiles ». *Frontiers in Plant Science* 12  
(2021): 639276. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.639276>.
- **Damien Le Moigne**, Nolwenn Guéguen, Juliette Salvaing. « Lipid Droplets in Plants: More  
than a Simple Fat Storage ». In *Advances in Botanical Research*. Academic Press, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.07.004>.

Brevet

- **Damien Le Moigne**, Juliette Salvaing, Alberto Amato. « ENHANCED TRIACYLGLYCEROL  
PRODUCTIVITY AND EXTRACTABILITY IN AN ENGINEERED MICROALGA ». European Patent Request.  
08 July 2022

## Références bibliographiques

### A

Abida, H. *et al.* (2015) 'Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricornutum*1', *Plant Physiology*, 167(1), pp. 118–136. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.114.252395>.

Académie des sciences (2017) [Conférence] J. LIVAGE - *La chimie douce quand la nature inspire la science*. Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=U0oINhpKgDQ> (Accessed: 8 September 2023).

Agarwal, A.K. and Garg, A. (2004) 'Seipin: a mysterious protein', *Trends in Molecular Medicine*, 10(9), pp. 440–444. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.07.009>.

Alipanah, L. *et al.* (2015) 'Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Journal of Experimental Botany*, 66(20), pp. 6281–6296. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv340>.

Allen, A.E. *et al.* (2011) 'Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms', *Nature*, 473(7346), pp. 203–207. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature10074>.

Allen, A.E., Vardi, A. and Bowler, C. (2006) 'An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms', *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), pp. 264–273. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.013>.

Apt, K.E., Kroth-Pancic, P.G. and Grossman, A.R. (1996) 'Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Molecular & general genetics: MGG*, 252(5), pp. 572–579. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02172403>.

'Arbre phylogénétique' (2023) *Wikipédia*. Available at: [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Arbre\\_phylog%C3%A9n%C3%A9tique&oldid=201943656](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Arbre_phylog%C3%A9n%C3%A9tique&oldid=201943656) (Accessed: 28 September 2023).

Arlt, H. *et al.* (2022) 'Seipin forms a flexible cage at lipid droplet formation sites', *Nature Structural & Molecular Biology*, 29(3), pp. 194–202. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00718-y>.

Armbrust, E.V. *et al.* (2004) 'The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism', *Science (New York, N.Y.)*, 306(5693), pp. 79–86. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1101156>.



Armbrust, E.V. (2009) 'The life of diatoms in the world's oceans', *Nature*, 459(7244), pp. 185–192. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08057>.

Asada, K. (2006) 'Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions', *Plant Physiology*, 141(2), pp. 391–396. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>.

Athenstaedt, K. and Daum, G. (2003) 'YMR313c/TGL3 Encodes a Novel Triacylglycerol Lipase Located in Lipid Particles of *Saccharomyces cerevisiae*\*, *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), pp. 23317–23323. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M302577200>.

Athenstaedt, K. and Daum, G. (2005) 'Tgl4p and Tgl5p, Two Triacylglycerol Lipases of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Are Localized to Lipid Particles\*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), pp. 37301–37309. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M507261200>.

## B

Bai, X. *et al.* (2021) 'Loss of the seipin gene perturbs eggshell formation in *Caenorhabditis elegans*', *Development (Cambridge)*, 147(20). Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.192997>.

Bailleul, B. *et al.* (2015) 'Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO<sub>2</sub> assimilation in diatoms', *Nature*, 524(7565), pp. 366–369. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14599>.

Barka, F. *et al.* (2016) 'Identification of a triacylglycerol lipase in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1861(3), pp. 239–248. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2015.12.023>.

Benoiston, A.-S. *et al.* (2017) 'The evolution of diatoms and their biogeochemical functions', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1728). Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0397>.

Bi, J. *et al.* (2014) 'Seipin promotes adipose tissue fat storage through the ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA', *Cell Metabolism*, 19(5), pp. 861–871. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.028>.

Binns, D. *et al.* (2010) *Seipin Is a Discrete Homooligomer*, ACS Publications. American Chemical Society. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi1013003>.

Block, M.A. *et al.* (2007) 'Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol', *Photosynthesis Research*, 92(2), pp. 225–244. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9195-8>.

Bohnert, M. (2020) 'New friends for seipin - Implications of seipin partner proteins in the life cycle of lipid droplets', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108, pp. 24–32. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.04.012>.

Bolik, S. (2022) *Rôle des lipides non-phosphorés dans l'architecture des membranes des plantes et des microalgues*. These de doctorat. Université Grenoble Alpes. Available at: <https://www.theses.fr/2022GRALV026> (Accessed: 14 September 2023).

Boudière, L. *et al.* (2014) 'Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(4), pp. 470–480. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.09.007>.

Boutet, E. *et al.* (2009) 'Seipin deficiency alters fatty acid Delta9 desaturation and lipid droplet formation in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy', *Biochimie*, 91(6), pp. 796–803. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.01.011>.

Bowler, C. *et al.* (2008) 'The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes', *Nature*, 456(7219), pp. 239–244. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07410>.

Bradford, M.M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254. Available at: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

Brinkman, E.K. *et al.* (2014) 'Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition', *Nucleic Acids Research*, 42(22), p. e168. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>.

Bryłka, K. *et al.* (2023) 'Uncertainties surrounding the oldest fossil record of diatoms', *Scientific Reports*, 13(1), p. 8047. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35078-8>.

Buseman, C.M. *et al.* (2006) 'Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves', *Plant Physiology*, 142(1), pp. 28–39. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.106.082115>.

## C

Cadoret, J.-P. and Bernard, O. (2008) 'La production de biocarburant lipidique avec des microalgues', *Société de Biologie*, pp. 201–211.

Cai, Y. *et al.* (2015) 'Arabidopsis SEIPIN Proteins Modulate Triacylglycerol Accumulation and Influence Lipid Droplet Proliferation', *The Plant Cell*, 27(9), pp. 2616–2636. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00588>.

Calleja, P., LETERRIER, M. and Marechal, E. (2015) 'Modified algae strain and method of triacylglycerol accumulation using said strain'. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2015008160A2/en> (Accessed: 26 September 2023).

Cartwright, B.R. *et al.* (2015) 'Seipin performs dissectible functions in promoting lipid droplet biogenesis and regulating droplet morphology', *Molecular Biology of the Cell*, 26(4), pp. 726–739. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-08-1303>.

Castro, I.G. *et al.* (2019) 'Promethin Is a Conserved Seipin Partner Protein', *Cells*, 8(3), p. 268. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8030268>.

Cavalier-Smith, T. (2003) 'Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae).', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1429), pp. 109–134. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1194>.

Chaal, B.K. and Green, B.R. (2005) 'Protein import pathways in "complex" chloroplasts derived from secondary endosymbiosis involving a red algal ancestor', *Plant Molecular Biology*, 57(3), pp. 333–342. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11103-004-7848-y>.

Chauton, M.S. *et al.* (2013) 'Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles', *Plant Physiology*, 161(2), pp. 1034–1048. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.112.206177>.

Chen, C.-X. *et al.* (2015) 'Identification and characterization of three genes encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) from the microalga *Myrmecia incisa* Reisigl', *Algal Research*, 12, pp. 280–288. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.007>.

Chung, J. *et al.* (2019) 'LDAF1 and Seipin Form a Lipid Droplet Assembly Complex', *Developmental Cell*, 51(5), pp. 551-563.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.006>.

Combot, Y. *et al.* (2022) 'Seipin localizes at endoplasmic-reticulum-mitochondria contact sites to control mitochondrial calcium import and metabolism in adipocytes', *Cell Reports*, 38(2), p. 110213. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110213>.

Conte, M. *et al.* (2018) 'Screening for Biologically Annotated Drugs That Trigger Triacylglycerol Accumulation in the Diatom *Phaeodactylum*', *Plant Physiology*, 177(2), pp. 532–552. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01804>.

Coulon, D. *et al.* (2020a) 'Arabidopsis LDIP protein locates at a confined area within the lipid droplet surface and favors lipid droplet formation', *Biochimie*, 169, pp. 29–40. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.09.018>.

Coulon, D. *et al.* (2020b) 'Arabidopsis LDIP protein locates at a confined area within the lipid droplet surface and favors lipid droplet formation', *Biochimie*, 169, pp. 29–40. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.09.018>.

Cruz de Carvalho, M.H. *et al.* (2016) 'Noncoding and coding transcriptome responses of a marine diatom to phosphate fluctuations', *The New Phytologist*, 210(2), pp. 497–510. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.13787>.

Cui, X. *et al.* (2011) 'Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy', *Human Molecular Genetics*, 20(15), pp. 3022–3030. Available at: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr205>.

Cui, Y. *et al.* (2013) 'Cloning and characterization of a novel diacylglycerol acyltransferase from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Journal of Applied Phycology*, 25(5), pp. 1509–1512. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9991-9>.

Cui, Y. *et al.* (2018) 'Characterization and engineering of a dual-function diacylglycerol acyltransferase in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Biotechnology for Biofuels*, 11, p. 32. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1029-8>.

Curtis, B.A. *et al.* (2012) 'Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs', *Nature*, 492(7427), pp. 59–65. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11681>.

## D

Dahlqvist, A. *et al.* (2000) 'Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), pp. 6487–6492. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.120067297>.

Dell'Aquila, G. and Maier, U.G. (2020) 'Specific acclimations to phosphorus limitation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Biological Chemistry*, 401(12), pp. 1495–1501. Available at: <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0197>.

Demé, B. *et al.* (2014) 'Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(8), pp. 3373–3383. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.13-247395>.

Dhiman, R. *et al.* (2020) 'Mechanisms of protein targeting to lipid droplets: A unified cell biological and biophysical perspective', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108, pp. 4–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.03.004>.

Diner, R.E. *et al.* (2016) 'Genetic Manipulation of Competition for Nitrate between Heterotrophic Bacteria and Diatoms', *Frontiers in Microbiology*, 7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00880>.

Ding, L. *et al.* (2018) 'Seipin regulates lipid homeostasis by ensuring calcium-dependent mitochondrial metabolism', *The EMBO journal*, 37(17), p. e97572. Available at: <https://doi.org/10.15252/emj.201797572>.

Dolch, L.-J. *et al.* (2017) 'A Palmitic Acid Elongase Affects Eicosapentaenoic Acid and Plastidial Monogalactosyldiacylglycerol Levels in *Nannochloropsis*', *Plant Physiology*, 173(1), pp. 742–759. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.16.01420>.

Dolch, L.-J. and Maréchal, E. (2015) 'Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Marine Drugs*, 13(3), pp. 1317–1339. Available at: <https://doi.org/10.3390/md13031317>.

Douce, R., Holtz, R.B. and Benson, A.A. (1973) 'Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts', *The Journal of Biological Chemistry*, 248(20), pp. 7215–7222.

Draaisma, R.B. *et al.* (2013) 'Food commodities from microalgae', *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), pp. 169–177. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.012>.

Du, Z.-Y. and Benning, C. (2016) 'Triacylglycerol Accumulation in Photosynthetic Cells in Plants and Algae', *Sub-Cellular Biochemistry*, 86, pp. 179–205. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_8).

## E

Eastmond, P.J. (2006) '*SUGAR-DEPENDENT1* Encodes a Patatin Domain Triacylglycerol Lipase That Initiates Storage Oil Breakdown in Germinating *Arabidopsis* Seeds', *The Plant Cell*, 18(3), pp. 665–675. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040543>.

Eichmann, T.O. and Lass, A. (2015) 'DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol—stereochemistry, metabolism, and signaling', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(20), pp. 3931–3952. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1982-3>.

Eisenberg-Bord, M. *et al.* (2018) 'Identification of seipin-linked factors that act as determinants of a lipid droplet subpopulation', *The Journal of Cell Biology*, 217(1), pp. 269–282. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201704122>.

## F

Falciatore, A. *et al.* (1999) 'Transformation of Nonselectable Reporter Genes in Marine Diatoms', *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 1(3), pp. 239–251. Available at: <https://doi.org/10.1007/pl00011773>.

Falkowski, P.G., Barber, R.T. and Smetacek, V. (1998) 'Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production', *Science (New York, N.Y.)*, 281(5374), pp. 200–207. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>.

Fei, W. *et al.* (2008) 'Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast', *The Journal of Cell Biology*, 180(3), pp. 473–482. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200711136>.

Fei, W., Shui, G., *et al.* (2011) 'A Role for Phosphatidic Acid in the Formation of "Supersized" Lipid Droplets', *PLOS Genetics*, 7(7), p. e1002201. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002201>.

Fei, W., Li, H., *et al.* (2011) 'Molecular characterization of seipin and its mutants: implications for seipin in triacylglycerol synthesis', *Journal of Lipid Research*, 52(12), pp. 2136–2147. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M017566>.

Fei, W., Du, X. and Yang, H. (2011) 'Seipin, adipogenesis and lipid droplets', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 22(6), pp. 204–210. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.02.004>.

Field, C.B. *et al.* (1998) 'Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components', *Science*, 281(5374), pp. 237–240. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>.

Flori, S. *et al.* (2016) 'Ultrastructure of the Periplastidial Compartment of the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*', *Protist*, 167(3), pp. 254–267. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.04.001>.

Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H. (1957) 'A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues', *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), pp. 497–509.

## G

Gehl, B. and Sweetlove, L.J. (2014) 'Mitochondrial Band-7 family proteins: scaffolds for respiratory chain assembly?', *Frontiers in Plant Science*, 5, p. 141. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00141>.

Gibson, D.G. *et al.* (2009) 'Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases', *Nature Methods*, 6(5), pp. 343–345. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.

Gibson, D.G. *et al.* (2010) 'Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome', *Science (New York, N.Y.)*, 329(5987), pp. 52–56. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1190719>.

Gilmour, D.J. (2019) 'Microalgae for biofuel production', *Advances in Applied Microbiology*, 109, pp. 1–30. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.10.001>.

Gong, Y. *et al.* (2013) 'Identification and characterization of PtDGAT2B, an acyltransferase of the DGAT2 acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase family in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *FEBS letters*, 587(5), pp. 481–487. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.015>.

Grippa, A. *et al.* (2015) 'The seipin complex Fld1/Ldb16 stabilizes ER-lipid droplet contact sites', *The Journal of Cell Biology*, 211(4), pp. 829–844. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201502070>.

Grosche, C. *et al.* (2014) 'The periplastidal compartment: a naturally minimized eukaryotic cytoplasm', *Current Opinion in Microbiology*, 22, pp. 88–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.017>.

Guéguen, N. *et al.* (2021) 'Lipid Droplets in Unicellular Photosynthetic Stramenopiles', *Frontiers in Plant Science*, 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.639276>.

Gueguen, N. (2022) *Characterisation of monogalactosyldiacylglycerol synthases in the model diatom Phaeodactylum tricornutum*. phdthesis. Université Grenoble Alpes [2020-....]. Available at: <https://theses.hal.science/tel-03771822> (Accessed: 16 September 2023).

Guihéneuf, F. *et al.* (2011) 'Cloning and molecular characterization of a novel acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1-like gene (PtDGAT1) from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *The FEBS Journal*, 278(19), pp. 3651–3666. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08284.x>.

Gupta, S. *et al.* (2007) 'Quantifying similarity between motifs', *Genome Biology*, 8(2), p. R24. Available at: <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r24>.

## H

Haeckel, E. (1834-1919) A. du texte (1899) *Kunstformen der Natur / von Prof. Dr. Ernst Haeckel, Gallica*. Available at: <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/btv1b525055842> (Accessed: 8 September 2023).

Hamilton, J.A. and Small, D.M. (1981) 'Solubilization and localization of triolein in phosphatidylcholine bilayers: a <sup>13</sup>C NMR study.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), pp. 6878–6882. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6878>.

Han, S. *et al.* (2015) 'Dissecting seipin function: the localized accumulation of phosphatidic acid at ER/LD junctions in the absence of seipin is suppressed by Sei1p( $\Delta$ Nterm) only in combination with Ldb16p', *BMC cell biology*, 16, p. 29. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12860-015-0075-3>.

Harris, W.S., Kris-Etherton, P.M. and Harris, K.A. (2008) 'Intakes of long-chain omega-3 fatty acid associated with reduced risk for death from coronary heart disease in healthy adults', *Current Atherosclerosis Reports*, 10(6), pp. 503–509. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11883-008-0078-z>.

Haslam, R.P. *et al.* (2020) 'Overexpression of an endogenous type 2 diacylglycerol acyltransferase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* enhances lipid production and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content', *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), p. 87. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01726-8>.

Hu, Q. *et al.* (2008) 'Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances', *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 54(4), pp. 621–639. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>.

Huang, J. *et al.* (2023) 'Equal distribution of lipid droplets in daughter cells is regulated by microtubules', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 22(12), pp. 1421–1433. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384101.2023.2210335>.



Huang, J. and Gogarten, J.P. (2007) 'Did an ancient chlamydial endosymbiosis facilitate the establishment of primary plastids?', *Genome Biology*, 8(6), p. R99. Available at: <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-6-r99>.

Huang, T. *et al.* (2023) 'Proteomes reveal the lipid metabolic network in the complex plastid of *Phaeodactylum tricornutum*', *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.16477>.

Hulo, N. *et al.* (2006) 'The PROSITE database', *Nucleic Acids Research*, 34(suppl\_1), pp. D227–D230. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkj063>.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (ed.) (2022) 'Summary for Policymakers', in *Global Warming of 1.5°C: IPCC Special Report on Impacts of Global Warming of 1.5°C above Pre-industrial Levels in Context of Strengthening Response to Climate Change, Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 1–24. Available at: <https://doi.org/10.1017/9781009157940.001>.

Ischebeck, T. *et al.* (2020) 'Lipid droplets in plants and algae: Distribution, formation, turnover and function', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108, pp. 82–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.014>.

Jallet, D. *et al.* (2020) 'Mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation is required for storage-lipid catabolism in a marine diatom', *The New Phytologist*, 228(3), pp. 946–958. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.16744>.

Jaussaud, A. *et al.* (2020) 'Stepwise Biogenesis of Subpopulations of Lipid Droplets in Nitrogen Starved *Phaeodactylum tricornutum* Cells', *Frontiers in Plant Science*, 11, p. 48. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00048>.

Jouhet, J. *et al.* (2017) 'LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: Consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation', *PLoS One*, 12(8), p. e0182423. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182423>.

Jumper, J. *et al.* (2021a) 'Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold', *Nature*, 596(7873), pp. 583–589. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

Jumper, J. *et al.* (2021b) 'Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold', *Nature*, 596(7873), pp. 583–589. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

Kajikawa, M. *et al.* (2019) 'Isolation and Characterization of Chlamydomonas Autophagy-Related Mutants in Nutrient-Deficient Conditions', *Plant and Cell Physiology*, 60(1), pp. 126–138. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy193>.

Käll, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E.L.L. (2007) 'Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server', *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), pp. W429–W432. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm256>.

Karas, B.J. *et al.* (2015) 'Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation', *Nature Communications*, 6, p. 6925. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms7925>.

Ke, J. *et al.* (2000) 'The Role of Pyruvate Dehydrogenase and Acetyl-Coenzyme A Synthetase in Fatty Acid Synthesis in Developing Arabidopsis Seeds', *Plant Physiology*, 123(2), pp. 497–508.

## K

Kilian, O. and Kroth, P.G. (2005) 'Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids', *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 41(2), pp. 175–183. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02294.x>.

Klug, Y.A. *et al.* (2021) 'Mechanism of lipid droplet formation by the yeast Sei1/Ldb16 Seipin complex', *Nature Communications*, 12(1), p. 5892. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26162-6>.

Krogh, A. *et al.* (2001) 'Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes', *Journal of Molecular Biology*, 305(3), pp. 567–580. Available at: <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.

## L

Le Moigne, D., Guéguen, N. and Salvaing, J. (2022) 'Chapter Five - Lipid droplets in plants: More than a simple fat storage', in F. Rébeillé and E. Maréchal (eds) *Advances in Botanical Research*. Academic Press (Lipids in Plants and Algae: From Fundamental Science to Industrial Applications), pp. 191–223. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.07.004>.

Lee, A.K., Lewis, D.M. and Ashman, P.J. (2012) 'Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements', *Biomass and Bioenergy*, 46, pp. 89–101. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>

- Leyland, B. *et al.* (2020) 'High Resolution Proteome of Lipid Droplets Isolated from the Pennate Diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) Strain pt4 provides mechanistic insights into complex intracellular coordination during nitrogen deprivation', *Journal of Phycology*, 56(6), pp. 1642–1663. Available at: <https://doi.org/10.1111/jpy.13063>.
- Leyland, B., Boussiba, S. and Khozin-Goldberg, I. (2020) 'A Review of Diatom Lipid Droplets', *Biology*, 9(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/biology9020038>.
- Li, R., Yu, K. and Hildebrand, D.F. (2010) 'DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants', *Lipids*, 45(2), pp. 145–157. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3385-4>.
- Li, X., Pan, Y. and Hu, H. (2018) 'Identification of the triacylglycerol lipase in the chloroplast envelope of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Algal Research*, 33, pp. 440–447. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.023>.
- Li, Y. *et al.* (2022) 'Role of Seipin in Human Diseases and Experimental Animal Models', *Biomolecules*, 12(6), p. 840. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom12060840>.
- Li-Beisson, Y. *et al.* (2019) 'The lipid biochemistry of eukaryotic algae', *Progress in Lipid Research*, 74, pp. 31–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.003>.
- Liu, L. *et al.* (2014) 'Adipose-specific knockout of SEIPIN/BSCL2 results in progressive lipodystrophy', *Diabetes*, 63(7), pp. 2320–2331. Available at: <https://doi.org/10.2337/db13-0729>.
- Liu, Q. *et al.* (2012) 'Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology', *Progress in Lipid Research*, 51(4), pp. 350–377. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.06.001>.
- Lu, Y. *et al.* (2017) 'Identification of a putative seipin ortholog involved in lipid accumulation in marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*', *Journal of Applied Phycology*, 29(6), pp. 2821–2829. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1173-8>.
- Lundin, C. *et al.* (2006) 'Membrane topology of the human seipin protein', *FEBS Letters*, 580(9), pp. 2281–2284. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.040>.
- Lupette, J. (2018) *Développement, architecture et dynamique des gouttelettes lipidiques de la diatomée Phaeodactylum tricornutum*. These de doctorat. Université Grenoble Alpes (ComUE). Available at: <https://theses.fr/2018GREAV039> (Accessed: 26 September 2023).

Lupette, J. *et al.* (2019) 'The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Algal Research*, 38, p. 101415. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101415>.

## M

Madawala, S.R.P. *et al.* (2011) 'Novel Conjugates of 1,3-Diacylglycerol and Lipoic Acid: Synthesis, DPPH Assay, and RP-LC-MS-APCI Analysis', *Journal of Lipids*, 2011, p. 419809. Available at: <https://doi.org/10.1155/2011/419809>.

Magré, J. *et al.* (2001) 'Identification of the gene altered in Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13', *Nature Genetics*, 28(4), pp. 365–370. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng585>.

Maréchal, E. (2021) 'Carburants à base d'algues oléagineuses - Principes, filières, verrous', *Éco-conception et innovation responsable* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.51257/a-v2-in186>.

Marechal, E. *et al.* (2023) *Adaptive traits of cysts of the snow alga Sanguina nivaloides unveiled by 3D subcellular imaging*. Available at: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3038444/v1>.

Materna, A.C. *et al.* (2009) 'FIRST INDUCED PLASTID GENOME MUTATIONS IN AN ALGA WITH SECONDARY PLASTIDS: psbA MUTATIONS IN THE DIATOM PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM (BACILLARIOPHYCEAE) REVEAL CONSEQUENCES ON THE REGULATION OF PHOTOSYNTHESIS(1)', *Journal of Phycology*, 45(4), pp. 838–846. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00711.x>.

Maumus, F. *et al.* (2009) 'Potential impact of stress activated retrotransposons on genome evolution in a marine diatom', *BMC genomics*, 10, p. 624. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-624>.

Mizrachi, A. *et al.* (2019) 'Light-dependent single-cell heterogeneity in the chloroplast redox state regulates cell fate in a marine diatom', *eLife*. Edited by D.K. Newman and I.T. Baldwin, 8, p. e47732. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.47732>.

Moellering, E.R. and Benning, C. (2010) 'RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*', *Eukaryotic Cell*, 9(1), pp. 97–106. Available at: <https://doi.org/10.1128/EC.00203-09>.

Moore, T.S., Du, Z. and Chen, Z. (2001) 'Membrane lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. In vitro biosynthesis of diacylglyceryltrimethylhomoserine', *Plant Physiology*, 125(1), pp. 423–429. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.423>.

Moustafa, A. *et al.* (2009) 'Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms', *Science (New York, N.Y.)*, 324(5935), pp. 1724–1726. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1172983>.

Murakami, R. and Hashimoto, H. (2009) 'Unusual nuclear division in *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae, Heterokonta) which may ensure faithful transmission of secondary plastids', *Protist*, 160(1), pp. 41–49. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.protis.2008.09.002>.

Murison, V., Hérault, J., Schoefs, B., *et al.* (2023) 'Bioinformatics-Based Screening Approach for the Identification and Characterization of Lipolytic Enzymes from the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Marine Drugs*, 21(2), p. 125. Available at: <https://doi.org/10.3390/md21020125>.

Murison, V., Hérault, J., Côme, M., *et al.* (2023) 'Comparison of two *Phaeodactylum tricornutum* ecotypes under nitrogen starvation and resupply reveals distinct lipid accumulation strategies but a common degradation process', *Frontiers in Plant Science*, 14. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1257500> (Accessed: 28 September 2023).

Mus, F. *et al.* (2013) 'Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), pp. 3625–3642. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4747-7>.

## N

Nakov, T., Beaulieu, J.M. and Alverson, A.J. (2018) 'Accelerated diversification is related to life history and locomotion in a hyperdiverse lineage of microbial eukaryotes (Diatoms, Bacillariophyta)', *The New Phytologist*, 219(1), pp. 462–473. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.15137>.

Niu, Y.-F. *et al.* (2016) 'Molecular characterization of a glycerol-3-phosphate acyltransferase reveals key features essential for triacylglycerol production in *Phaeodactylum tricornutum*', *Biotechnology for Biofuels*, 9, p. 60. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0478-1>.

Nonoyama, T. *et al.* (2019) 'Proteomics analysis of lipid droplets indicates involvement of membrane trafficking proteins in lipid droplet breakdown in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris*', *Algal Research*, 44, p. 101660. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101660>.

Nymark, M. *et al.* (2023) 'Loss of CpFTSY Reduces Photosynthetic Performance and Affects Insertion of PsaC of PSI in Diatoms', *Plant & Cell Physiology*, 64(6), pp. 583–603. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad014>.

## O

Onyou Nam, Irina Grouneva and Luke C. M. Mackinder (2022) 'Endogenous GFP tagging in the diatom *Thalassiosira pseudonana*', *bioRxiv*, p. 2022.09.30.510313. Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.09.30.510313>.

*Orphanet: Lipodystrophie congénitale de Berardinelli Seip* (no date). Available at: [https://www.orpha.net/consor/cgi-](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=1007&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=528&Disease_Disease_Search_diseaseType=ORPHA&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Lipodystrophie-congenitale-de-Berardinelli-Seip&title=Lipodystrophie%20cong%20nitale%20de%20Berardinelli-Seip&search=Disease_Search_Simple)

[bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=1007&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=528&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=ORPHA&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Lipodystrophie-congenitale-de-Berardinelli-Seip&title=Lipodystrophie%20cong%20nitale%20de%20Berardinelli-Seip&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=1007&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=528&Disease_Disease_Search_diseaseType=ORPHA&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Lipodystrophie-congenitale-de-Berardinelli-Seip&title=Lipodystrophie%20cong%20nitale%20de%20Berardinelli-Seip&search=Disease_Search_Simple) (Accessed: 21 June 2023).

## P

Pagac, M. *et al.* (2016) 'SEIPIN Regulates Lipid Droplet Expansion and Adipocyte Development by Modulating the Activity of Glycerol-3-phosphate Acyltransferase', *Cell Reports*, 17(6), pp. 1546–1559. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.037>.

Payne, V.A. *et al.* (2008) 'The human lipodystrophy gene BSCL2/seipin may be essential for normal adipocyte differentiation', *Diabetes*, 57(8), pp. 2055–2060. Available at: <https://doi.org/10.2337/db08-0184>.

Perktold, A. *et al.* (2007) 'Organelle association visualized by three-dimensional ultrastructural imaging of the yeast cell', *FEMS yeast research*, 7(4), pp. 629–638. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00226.x>.

Petroutsos, D. *et al.* (2014) 'Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways--from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids', *Progress in Lipid Research*, 54, pp. 68–85. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.02.001>.

Plöhn, M. *et al.* (2021) 'Wastewater treatment by microalgae', *Physiologia Plantarum*, 173(2), pp. 568–578. Available at: <https://doi.org/10.1111/ppl.13427>.

Prihoda, J. *et al.* (2012) 'Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms', *Journal of Experimental Botany*, 63(4), pp. 1543–1557. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/err441>.

Pyc, M. *et al.* (2017) 'Arabidopsis lipid droplet-associated protein (LDAP) - interacting protein (LDIP) influences lipid droplet size and neutral lipid homeostasis in both leaves and seeds', *Plant J*, 92(6), pp. 1182–1201. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.13754>.

Pyc, M. *et al.* (2021) 'LDIP cooperates with SEIPIN and LDAP to facilitate lipid droplet biogenesis in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 33(9), pp. 3076–3103. Available at: <https://doi.org/10.1093/plcell/koab179>.

## R

Reyes-Prieto, A. *et al.* (2006) 'Cyanobacterial contribution to algal nuclear genomes is primarily limited to plastid functions', *Current biology: CB*, 16(23), pp. 2320–2325. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.063>.

Richard Evans *et al.* (2022) 'Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer', *bioRxiv*, p. 2021.10.04.463034. Available at: <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>.

Rosenwasser, S., Graff van Creveld, S., *et al.* (2014) 'Mapping the diatom redox-sensitive proteome provides insight into response to nitrogen stress in the marine environment', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7), pp. 2740–2745. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1319773111>.

Rosenwasser, S., Mausz, M.A., *et al.* (2014) 'Rewiring Host Lipid Metabolism by Large Viruses Determines the Fate of *Emiliania huxleyi*, a Bloom-Forming Alga in the Ocean', *The Plant Cell*, 26(6), pp. 2689–2707. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125641>.

Ryall, K., Harper, J.T. and Keeling, P.J. (2003) 'Plastid-derived Type II fatty acid biosynthetic enzymes in chromists', *Gene*, 313, pp. 139–148. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00671-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00671-1).

## S

Saha, S. *et al.* (2006) 'Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase', *Plant Physiology*, 141(4), pp. 1533–1543. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.106.082198>.

Salo, V.T. *et al.* (2016) 'Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery', *The EMBO journal*, 35(24), pp. 2699–2716. Available at: <https://doi.org/10.15252/emboj.201695170>.

Salo, V.T. (2023) 'Seipin—still a mysterious protein?', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2023.1112954> (Accessed: 24 March 2023).

Santiago Gutierrez *et al.* (2022) 'MembraneFold: Visualising transmembrane protein structure and topology', *bioRxiv*, p. 2022.12.06.518085. Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.12.06.518085>.

Schwarz, V. *et al.* (2017) 'Carbon starvation induces lipid degradation via autophagy in the model alga *Micrasterias*', *Journal of Plant Physiology*, 208, pp. 115–127. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.11.008>.

Sciandra, T. (2022) *Mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la survie de Fragilariopsis cylindrus (diatomée polaire) à une période d'obscurité prolongée*. These de doctorat. université Paris-Saclay. Available at: <https://www.theses.fr/2022UPASB014> (Accessed: 12 October 2023).

Shu, Q., Pan, Y. and Hu, H. (2022) 'CGI-58 Protein Acts as a Positive Regulator of Triacylglycerol Accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.4014/jmb.2209.09029>.

Shu, Q., Pan, Y. and Hu, H. (2023) 'CGI-58 Protein Acts as a Positive Regulator of Triacylglycerol Accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), pp. 242–250. Available at: <https://doi.org/10.4014/jmb.2209.09029>.

Sim, M.F.M. *et al.* (2020) 'Oligomers of the lipodystrophy protein seipin may co-ordinate GPAT3 and AGPAT2 enzymes to facilitate adipocyte differentiation', *Scientific Reports*, 10(1), p. 3259. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59982-5>.

Stillwell, W. (2016) *An Introduction to Biological Membranes (Second Edition)*.

Stoermer, E.F and Julius, M.L. (2003) 'Centric diatoms', *Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*, pp. 559–594.

Stringer, C. *et al.* (2021) 'Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation', *Nature Methods*, 18(1), pp. 100–106. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x>.

Sui, X. *et al.* (2018) 'Cryo-electron microscopy structure of the lipid droplet-formation protein seipin', *The Journal of Cell Biology*, 217(12), pp. 4080–4091. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201809067>.



Szymanski, K.M. *et al.* (2007) 'The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), pp. 20890–20895. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0704154104>.

## T

Talukder, Md.M.U. *et al.* (2015) 'Seipin oligomers can interact directly with AGPAT2 and lipin 1, physically scaffolding critical regulators of adipogenesis', *Molecular Metabolism*, 4(3), pp. 199–209. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.12.013>.

Tanaka, T., Yoneda, K. and Maeda, Y. (2022) 'Lipid Metabolism in Diatoms', in *The Molecular Life Of Diatoms*. A. Falciatore, T. Mock. Springer Nature.

Taparia, Y. *et al.* (2021a) 'Multiplexed Genome Editing via an RNA Polymerase II Promoter-Driven sgRNA Array in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Insights Into the Role of StLDP', *Frontiers in Plant Science*, 12, p. 784780. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.784780>.

Taparia, Y. *et al.* (2021b) 'Multiplexed Genome Editing via an RNA Polymerase II Promoter-Driven sgRNA Array in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Insights Into the Role of StLDP', *Frontiers in Plant Science*, 12, p. 784780. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.784780>.

Taurino, M. *et al.* (2018) 'SEIPIN Proteins Mediate Lipid Droplet Biogenesis to Promote Pollen Transmission and Reduce Seed Dormancy', *Plant Physiology*, 176(2), pp. 1531–1546. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01430>.

Teixeira, V. *et al.* (2018) 'Regulation of lipid droplets by metabolically controlled Ldo isoforms', *The Journal of Cell Biology*, 217(1), pp. 127–138. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201704115>.

Theurey, P. and Rieusset, J. (2017) 'Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(1), pp. 32–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.09.002>.

Tian, Y. *et al.* (2011) 'Tissue-Autonomous Function of *Drosophila* Seipin in Preventing Ectopic Lipid Droplet Formation', *PLOS Genetics*, 7(4), p. e1001364. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001364>.

Tréguer, P. *et al.* (1995) 'The silica balance in the world ocean: a reestimate', *Science (New York, N.Y.)*, 268(5209), pp. 375–379. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.268.5209.375>.

Trentacoste, E.M. *et al.* (2013) 'Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(49), pp. 19748–19753. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1309299110>.

Tsai, C.-H. *et al.* (2018) 'Recovery from N Deprivation Is a Transcriptionally and Functionally Distinct State in *Chlamydomonas*', *Plant Physiology*, 176(3), pp. 2007–2023. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01546>.

## U

Uwizeye, C. *et al.* (2021) 'Morphological bases of phytoplankton energy management and physiological responses unveiled by 3D subcellular imaging', *Nature Communications*, 12(1), p. 1049. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21314-0>.

## V

Vieler, A. *et al.* (2012) 'Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779', *PLoS genetics*, 8(11), p. e1003064. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003064>.

Villanova, V. and Spetea, C. (2021) 'Mixotrophy in diatoms: Molecular mechanism and industrial potential', *Physiologia Plantarum*, 173(2), pp. 603–611. Available at: <https://doi.org/10.1111/ppl.13471>.

Vinayak, V. *et al.* (2014) 'Discovery of a Diatom That Oozes Oil', *Advanced Science Letters*, 20. Available at: <https://doi.org/10.1166/asl.2014.5591>.

Vinayak, V. *et al.* (2015) 'Diatom milking: a review and new approaches', *Marine Drugs*, 13(5), pp. 2629–2665. Available at: <https://doi.org/10.3390/md13052629>.

de Vries, J. and Ischebeck, T. (2020) 'Ties between Stress and Lipid Droplets Pre-date Seeds', *Trends in Plant Science*, 25(12), pp. 1203–1214. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.07.017>.

## W

Walther, T.C. *et al.* (2023) 'Structure and function of lipid droplet assembly complexes', *Current Opinion in Structural Biology*, 80, p. 102606. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102606>.

Wang, C.-W., Miao, Y.-H. and Chang, Y.-S. (2014) 'Control of lipid droplet size in budding yeast requires the collaboration between Fld1 and Ldb16', *Journal of Cell Science*, 127(Pt 6), pp. 1214–1228. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.137737>.

Wang, H. *et al.* (2016) 'Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets', *eLife*. Edited by S.G. Young, 5, p. e16582. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.16582>.

Wang, X. *et al.* (2017) 'A lipid droplet-associated protein involved in lipid droplet biogenesis and triacylglycerol accumulation in the oleaginous microalga *Phaeodactylum tricornutum*', *Algal Research*, 26, pp. 215–224. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.028>.

Waring, J. *et al.* (2010) 'Light-Induced Responses of Oxygen Photoreduction, Reactive Oxygen Species Production and Scavenging in Two Diatom Species<sup>1</sup>', *Journal of Phycology*, 46(6), pp. 1206–1217. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00919.x>.

Wendel, A.A., Lewin, T.M. and Coleman, R.A. (2009) 'Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), pp. 501–506. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.10.010>.

Windpassinger, C. *et al.* (2004) 'Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome', *Nature Genetics*, 36(3), pp. 271–276. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng1313>.

Wolinski, H. *et al.* (2011) 'A role for seipin in lipid droplet dynamics and inheritance in yeast', *Journal of Cell Science*, 124(Pt 22), pp. 3894–3904. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.091454>.

Wolinski, H. *et al.* (2015) 'Seipin is involved in the regulation of phosphatidic acid metabolism at a subdomain of the nuclear envelope in yeast', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1851(11), pp. 1450–1464. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.08.003>.

## Y

Yan, R. *et al.* (2018) 'Human SEIPIN Binds Anionic Phospholipids', *Developmental Cell*, 47(2), pp. 248–256.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.010>.

Yang, J. *et al.* (2022) 'PDAT regulates PE as transient carbon sink alternative to triacylglycerol in *Nannochloropsis*', *Plant Physiology*, 189(3), pp. 1345–1362. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac160>.

Yang, Z.-K. *et al.* (2014) 'Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress', *Environmental Microbiology*, 16(6), pp. 1793–1807. Available at: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12411>.

Yoneda, K. *et al.* (2016) 'Identification of a Major Lipid Droplet Protein in a Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Plant Cell Physiol*, 57(2), pp. 397–406. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv204>.

Yoneda, K. *et al.* (2023) 'Stramenopile-Type Lipid Droplet Protein Functions as a Lipid Droplet Scaffold Protein in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*', *Plant & Cell Physiology*, 64(7), pp. 803–813. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad040>.

Yoon, H.S. *et al.* (2004) 'A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes', *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), pp. 809–818. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/msh075>.

Yoon, K. *et al.* (2012) 'Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase Is a Multifunctional Enzyme Involved in Membrane Lipid Turnover and Degradation While Synthesizing Triacylglycerol in the Unicellular Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*', *The Plant Cell*, 24(9), pp. 3708–3724. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100701>.

Yoshitake, Y., Ohta, H. and Shimojima, M. (2019) 'Autophagy-Mediated Regulation of Lipid Metabolism and Its Impact on the Growth in Algae and Seed Plants', *Frontiers in Plant Science*, 10, p. 709. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00709>.

## Z

Zhang, M. *et al.* (2009) 'DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development', *The Plant Cell*, 21(12), pp. 3885–3901. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071795>.

Zhang, M. *et al.* (2010) 'DGAT1 and PDAT1 Acyltransferases Have Overlapping Functions in *Arabidopsis* Triacylglycerol Biosynthesis and Are Essential for Normal Pollen and Seed Development', *The Plant Cell*, 21(12), pp. 3885–3901. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071795>.

Zhang, Y. *et al.* (2021) 'Lipid production is more than doubled by manipulating a diacylglycerol acyltransferase in algae', *GCB Bioenergy*, 13(1), pp. 185–200. Available at: <https://doi.org/10.1111/gcbb.12771>.

Zienkiewicz, A. *et al.* (2020) 'The Microalga *Nannochloropsis* during Transition from Quiescence to Autotrophy in Response to Nitrogen Availability', *Plant Physiology*, 182(2), pp. 819–839. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.19.00854>.

Zienkiewicz, K. *et al.* (2016) 'Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and physiological insights', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9, Part B), pp. 1269–1281. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.008>.

Zienkiewicz, K. and Zienkiewicz, A. (2020) 'Degradation of Lipid Droplets in Plants and Algae—Right Time, Many Paths, One Goal', *Frontiers in Plant Science*, 11. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.579019> (Accessed: 3 October 2023).

Zulu, N.N. *et al.* (2018) 'Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms', *Progress in Lipid Research*, 70, pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001>.

## Function of the Seipin protein during lipid droplet biogenesis in the diatom

### *Phaeodactylum tricornutum*

Microalgae encompass unicellular photosynthetic organisms whose diversity is represented throughout the tree of life. They colonize a variety of environments and are regularly subjected to numerous biotic and abiotic stresses. In response to these stresses, lipid droplets (LDs) can be produced. LDs are organelles composed of a hydrophobic core, predominantly containing triacylglycerols (TAGs), surrounded by a monolayer of glycerolipids embedded with numerous proteins. LDs are present in nearly all living organisms and are involved in various functions such as carbon and energy storage, remodeling of membrane lipids, synthesis and storage of hydrophobic molecules, and more. Increasingly, new functions are attributed to them, and LDs are now considered distinct organelles, highly dynamic and flexible, both in their lipid composition and protein complement.

The biogenesis of LDs occurs within the endomembrane system and is under the control of complex molecular machineries. In this process, the protein Seipin plays a major role and has been characterized in numerous organisms (plants, animals, yeast). This transmembrane protein forms an oligomer inserted into the endoplasmic reticulum membrane and functionally influences various aspects of LD biogenesis. For example, it is involved in determining LD budding orientation, controlling LD size, and regulating the TAG flux within LDs.

In the oleaginous diatom *Phaeodactylum tricornutum*, an isoform of Seipin (*PtSeipin*) has previously been identified, and the research presented here aimed to characterize its function. By combining structural prediction, phylogenetic, microscopy, lipidomic, and proteomic approaches, we have highlighted several unique features of *PtSeipin*. We observed that Seipin in diatoms and more broadly in stramenopiles are phylogenetically closer to those in animals and fungi than to photosynthetic organisms like plants and green algae. We also established that the loss of *PtSeipin* function leads to a pronounced phenotype, with the formation of oversized LDs, as observed in other species. However, uniquely, we observed a dramatic accumulation of TAGs, particularly under stress conditions, suggesting that additional specific regulatory mechanisms are involved in LD formation in *P. tricornutum*. Finally, the analysis of purified LD proteomes in *PtSeipin* mutants revealed that the protein *StLDP*, described as the major LD protein, is no longer recruited. These results open up new avenues for fundamental research, particularly in the search for Seipin partner proteins and the detailed study of its functional domains. Additionally, these findings also provide new insights for applied research in the field of next-generation biofuels

Keywords : diatom, lipid droplet, Seipin, StLDP, triacylglycerols, biofuels

**CEA Grenoble**

**Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (LPCV)**

UMR 5168 CEA/CNRS/Université Grenoble Alpes/UMR 1417 INRAE

17, Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France

## Fonction de la protéine Seipin dans la biogenèse des gouttelettes lipidiques chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*

Les microalgues englobent des organismes photosynthétiques unicellulaires dont la diversité couvre une large partie de l'arbre du vivant. Elles colonisent une grande variété d'environnements et sont régulièrement soumises à de nombreux stress biotiques et abiotiques. En réponse à ces stress, des gouttelettes lipidiques (LD) peuvent être produites. Les LD sont des organelles composés d'un cœur hydrophobe, contenant majoritairement des triacylglycerols (TAG), délimité par une monocouche de glycérolipides dans laquelle de nombreuses protéines sont enchâssées. Les LD sont présentes dans quasiment tous les organismes vivants et sont impliquées dans des fonctions variées comme le stockage de carbone et de molécules riches en énergie, le remodelage de lipides membranaires, la synthèse et le stockage de molécules hydrophobes, le stockage de carbone ou de molécules riches en énergie... De plus en plus de fonctions leur sont attribuées et les LD sont désormais considérées comme des organites à part entière, extrêmement dynamiques et douées d'une grande plasticité autant dans leur composition en lipides que dans le cortège protéique dont elles sont équipées.

La biogenèse des LD se fait à partir du système endomembranaire et sous contrôle de machineries moléculaires complexes. Dans ce processus, la protéine Seipin est un acteur majeur et a été caractérisée dans de nombreux organismes (plantes, animaux, levures). Cette protéine transmembranaire forme un oligomère inséré dans la membrane du réticulum endoplasmique et intervient au niveau fonctionnel sur différents aspects de la biogénèse de la LD. Elle est par exemple impliquée dans l'orientation du bourgeonnement de la LD, dans le contrôle de la taille des LD et dans le contrôle du flux de TAG dans la LD.

Chez la diatomée oléagineuse *Phaeodactylum tricornutum*, un isoforme de Seipin (*PtSeipin*) a été préalablement identifié ; les travaux présentés ici ont eu pour but de la caractériser fonctionnellement. En combinant des approches de prédictions de structure, de phylogénie, de microscopie, de lipidomique et de protéomique, nous avons pu mettre en évidence plusieurs caractéristiques uniques de *PtSeipin*. Nous avons pu constater que les Seipin de diatomées et plus généralement de stramenopiles sont phylogénétiquement plus proches de celles des animaux et des champignons que des plantes et des algues vertes. Nous avons également pu établir que la perte de fonction de *PtSeipin* aboutissait à un phénotype fort, avec la formation de LD surdimensionnées comme cela est observé chez d'autres espèces. En revanche, de manière tout à fait unique, nous avons observé une accumulation spectaculaire de TAG, notamment en situations de stress, ce qui suggère que des mécanismes de régulation supplémentaires et spécifiques sont impliqués dans la formation de la LD chez *P.tricornutum*. Enfin, l'analyse des protéomes de LD purifiées chez des mutants *PtSeipin* ont révélé notamment que la protéine StLDP, décrite comme la protéine majeure des LD, n'y est plus recrutée. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherche fondamentale, notamment dans la recherche de protéines partenaires de la Seipin et dans l'étude fine de ses domaines fonctionnels. En outre, ces résultats apportent également des éléments nouveaux dans la recherche appliquée aux domaines des biocarburants de dernière génération.

Keywords : diatomée, gouttelette lipidique, Seipin, StLDP, triacylglycérols, biocarburants

**CEA Grenoble**

**Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (LPCV)**

UMR 5168 CEA/CNRS/Université Grenoble Alpes/UMR 1417 INRAE

17, Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France