



HAL
open science

Rôle des bétaine lipides dans l'adaptation à la carence en phosphate chez les algues et les plantes

Sarah Salomon

► **To cite this version:**

Sarah Salomon. Rôle des bétaine lipides dans l'adaptation à la carence en phosphate chez les algues et les plantes. Biologie végétale. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2024. Français. NNT : 2024GRALV026 . tel-04793510

HAL Id: tel-04793510

<https://theses.hal.science/tel-04793510v1>

Submitted on 20 Nov 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

Rôle des bétaine lipides dans l'adaptation à la carence en phosphate chez les algues et les plantes

Influence of betaine lipids in adaptation to phosphate deficiency in algae and plants

Présentée par :

Sarah SALOMON

Direction de thèse :

Juliette JOUHET
CNRS Alpes

Directrice de thèse

Morgane MICHAUD
CNRS Alpes

Co-encadrante de thèse

Rapporteurs :

Yohann BOUTTE
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Aquitaine
Yonghua LI-BEISSON
DIRECTRICE DE RECHERCHE, CEA centre de Cadarache

Thèse soutenue publiquement le **11 octobre 2024**, devant le jury composé de :

Corinne MERCIER, PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble-Alpes	Présidente
Juliette JOUHET, DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes	Directrice de thèse
Morgane MICHAUD, CHARGÉE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Alpes	Co-directrice de thèse
Yohann BOUTTE, DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Aquitaine	Rapporteur
Yonghua LI-BEISSON, DIRECTRICE DE RECHERCHE, CEA centre de Cadarache	Rapporteuse
Philippe SOUDANT, DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Bretagne et Pays de la Loire	Examineur



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse Juliette Jouhet, directrice de l'équipe Biogénèse, dynamique et homéostasie des lipides membranaires (Lipids) au laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (LPCV). Juliette Jouhet m'a chaleureusement accueilli au sein de son équipe et accompagnée avec bienveillance tout au long de ma thèse. Son enthousiasme, sa grande disponibilité et son soutien m'ont permis d'avancer sereinement dans ce projet. Je retiens également la grande confiance qu'elle m'a accordée, sa créativité et la bonne humeur qu'elle communique à toutes les personnes avec qui elle travaille. Je n'aurais pas pu être mieux encadrée pour ma thèse et je lui en suis sincèrement reconnaissante.

Je remercie également Éric Maréchal, directeur du LPCV, de m'avoir gentiment accueilli dans son laboratoire.

Je remercie ensuite les membres de mon jury de thèse, Yonghua Li-Beisson, Yohann Boutté, Corinne Mercier, Sébastien Mongrand et Philippe Soudant, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je souhaite également remercier ma co-encadrante de thèse Morgane Michaud, pour son aide précieuse, ses conseils, sa gentillesse et sa disponibilité. Je souhaite aussi remercier Alberto Amato, pour m'avoir apporté son aide dans plusieurs projets, et notamment dans la réalisation de la revue sur les bêtaïnes lipides. Un grand merci à Olivier Bastien, dont l'aide a également été essentielle dans l'élaboration de cette revue.

Mes remerciements s'adressent ensuite à tous les membres de l'équipe Lipids. Je tiens à remercier en premier lieu Catherine Albrieux, toujours présente et disponible au laboratoire. Elle m'a apporté un soutien précieux dans mes expériences quotidiennes à la paillasse, et je garde également un excellent souvenir de toutes les discussions que nous avons partagées. J'adresse également mes remerciements à Marion Schilling, qui a été d'une aide essentielle dans l'analyse lipidique de mes échantillons et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Merci également à Valérie Gros et Mathilde Cussac pour leur aide dans les extractions de lipides, Élodie Billey, Martina Gagliardi et Morgane Lapeyre pour leurs conseils et leur expertise sur les microalgues, Sylvaine Roy pour son aide dans le traitement des données et Grégory Si Larbi et Denis Falconet pour les superbes images de microscopie qu'ils ont réalisé. Un grand merci à Gaëlle Villain, Jade Ezzedine, Yacine Diagne, Séverine Beille, Juliette Salvaing, Sassia Hadjadji et Camille Rak pour les bons moments partagés ensemble. Enfin, je souhaite remercier Sophie Mistri, Tiffany Guyonnet, Julie Flauto et Luigia Indorato pour leur aide et leur disponibilité dans la gestion administrative.

Un grand merci à Dimitri Tolleter pour son aide et son accompagnement essentiel dans les mesures de photosynthèse.

Je tiens ensuite à remercier les doctorants qui m'ont chaleureusement accueilli dans leur bureau à mon arrivée au laboratoire : Stéphanie Bolik, qui m'a introduit à son sujet avec bienveillance, Nolwenn Guéguen, avec qui j'ai partagé des discussions très enrichissantes, et Sébastien Leterme, dont la gaieté et l'enthousiasme m'ont tout de suite mise à l'aise. Enfin, un grand merci à mon voisin de bureau Damien Le Moigne. Les longues et folles divagations en fin d'après-midi lors de notre habituelle « tea time » m'ont grandement aidé pendant les périodes de fatigue et me manquent encore maintenant. Je me souviendrai de sa gentillesse, de ses conseils et de toutes les discussions que nous avons partagées.

Je souhaite évidemment remercier les deux doctorants, maintenant devenus amis, avec qui j'ai commencé ma thèse : Siqi Yan et Yannick Sérès. Je ne compte même plus le nombre de sorties et de randonnées que nous avons faits ensemble. Ces trois années ont été riches en découvertes grâce à eux et j'en garde d'excellents souvenirs. Je témoigne toute mon amitié à Siqi, qui a été d'un grand soutien tout au long de ma thèse et avec qui j'ai été très heureuse de partager cette expérience. Merci à Yannick pour son aide précieuse au laboratoire et pour son esprit d'initiative débordant qui nous a fait vivre tant d'aventures.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude envers Siraba Gueye, avec qui j'ai eu le plaisir de partager mon bureau pendant un an et demi. Sa douceur et sa gentillesse m'ont grandement aidé, je garderai un très beau souvenir de tous les moments que nous avons partagés et j'espère que nos chemins se recroiseront.

Merci à Pierre Guenzi-Tiberi, qui nous a régalarés avec ses pâtisseries, dont les discussions sont toujours riches et sans qui les pauses café n'auraient pas été les mêmes. Merci à Marta Carletti pour sa joie de vivre communicative et sa personnalité éclatante. Merci à Rachel Bonnarde pour son aide quotidienne, son écoute et sa grande générosité. Merci à Batoul Moubarak, pour son aura positive et son sourire en toutes circonstances. Merci à Eva Cavallari, avec qui j'ai eu le plaisir de partager nos séances de course à pieds et de randonnées. Merci à Camille Varrel et Ana-Bélèn Benitez-Tellez pour toutes les activités partagées ensemble.

Je souhaite également remercier chaleureusement Océane Oliva, pour la confiance qu'elle m'a accordée et pour l'aide précieuse et capitale qu'elle m'a apportée dans mes expériences de fin de thèse.

Merci à tous les doctorants et stagiaires avec qui j'ai partagé les pauses revitalisantes de fin de journée : Benjamin Fel, Sara Pullara, Aline Janeau, Moïra Courseaux, Aleksandra Mironova, Camille Serbutoviez-Verville, Aourégane Toussaint, Laura Turchi, Vangeli Geshkovski et Matteo Arrighi.

Enfin, un immense merci à mes parents et à ma sœur pour leur présence, leurs encouragements et leur soutien inébranlable.

Table des matières

Introduction.....	1
I. Introduction générale.....	2
1. Présentation du sujet d'étude.....	2
2. Origines et évolution des organismes photosynthétiques.....	3
2.1 L'émergence des eucaryotes photosynthétiques par l'endosymbiose primaire	3
2.2 L'évolution de la lignée verte	7
2.3 L'évolution des organismes photosynthétiques issus de l'endosymbiose secondaire	9
2.4 Les microalgues : des organismes d'intérêt majeur	10
3. Les glycérolipides, composants majoritaires des membranes cellulaires.....	11
3.1 Généralités sur les glycérolipides	11
3.2 Les acides gras	12
3.2.1 Structure, nomenclature et propriétés des acides gras	12
3.2.2 Synthèse et devenir des acides gras chez les organismes photosynthétiques	15
3.3 Les phospholipides	19
3.3.1 Description	19
3.3.2 Synthèse	20
3.4 Les glycoglycérolipides	23
3.4.1 Description	23
3.4.2 Synthèse	24
3.5 Les bêtaines lipides	25
II. Adaptation des organismes photosynthétiques à la carence en phosphate	26
1. L'importance du phosphate	26
1.1 Ressources et enjeux sociétaux.....	26
1.2 Généralités sur le métabolisme du phosphate chez les organismes photosynthétiques.	27
1.2.1 Transport et stockage du phosphate chez les plantes supérieures	27
1.2.2 Transport et stockage du phosphate chez les microalgues	29

1.3	Impacts de la carence en phosphate sur les organismes photosynthétiques	31
1.3.1	Impacts chez les plantes supérieures.....	31
1.3.2	Impacts chez les microalgues.....	32
2.	Remodelage lipidique des plantes terrestres en réponse à la carence en phosphate	33
2.1.	Hydrolyse des phospholipides.....	33
2.2.	Accumulation des galactolipides et des sulfolipides	35
2.3.	Autres aspects du remodelage lipidique	37
3.	Remodelage lipidique des microalgues en réponse à la carence en phosphate	37
III.	Les Bétaine Lipides : biosynthèse, fonctions et distribution	40
	Résultats.....	71
	Chapitre 1 : Etude de la production du DGTS chez les plantes supérieures	73
1.	Préambule	73
2.	Résultats de l'étude.....	76
3.	Conclusion et perspectives.....	111
	Chapitre 2 : Etude du rôle des bétaines lipides chez la microalgue <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	115
1.	Préambule	115
2.	Résultats de l'étude.....	117
2.1.	Génération de mutants KO par la méthode CRISPR-Cas9.....	117
2.2.	Validation de l'implication du gène BTA1 dans la synthèse du DGTA.....	118
2.3.	Impact de l'absence du DGTA sur la croissance et la morphologie des cellules de <i>P. tricornutum</i>	119
2.4.	Impact de l'absence du DGTA sur le profil lipidique des cellules de <i>P. tricornutum</i>	122
3.	Conclusion et perspectives.....	137
	Conclusion générale et perspectives du projet	143
1.	Etude de la production du DGTS chez les plantes supérieures.....	146
2.	Etude du rôle des bétaine lipides chez la microalgues <i>P. tricornutum</i>	149
3.	Synthèse générale	153
	Matériels et Méthodes	157

1.	Organismes d'étude et conditions de culture	159
1.1.	La plante modèle <i>Arabidopsis thaliana</i>	159
1.1.1.	Ecotype	159
1.1.2.	Stérilisation et vernalisation des graines.....	159
1.1.3.	Culture in vitro et récolte des plantules.....	159
1.1.4.	Génération de cals à partir de plantules	159
1.1.5.	Culture et récolte des cals en milieu liquide	160
1.2.	La plante modèle <i>Nicotiana benthamiana</i>	160
1.2.1.	Description et conditions de culture	160
1.2.2.	Récolte des feuilles infiltrées.....	160
1.3.	La bactérie compétente <i>Escherishia coli</i> NEB5 α	161
1.4.	L'agrobactérie <i>Agrobacterum tumefaciens</i>	161
1.5.	La microalgue modèle <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	162
1.5.1.	Informations sur <i>P. tricornutum</i> et sur la souche utilisée.....	162
1.5.2.	Composition du milieu de culture.....	162
1.5.3.	Conditions de culture	163
1.5.4.	Récolte des cellules	164
2.	Méthodes de biologie moléculaire.....	164
2.1.	Réaction de polymérisation en chaîne	164
2.2.	La méthode d'assemblage Gibson.....	165
2.3.	Transformation des bactéries <i>E. coli</i> NEB5 α	165
2.4.	Transformation des agrobactéries <i>A. tumefaciens</i>	165
2.5.	Extraction et purification d'ADN depuis <i>E.coli</i>	166
2.6.	Constructions utilisées pour les transformations stables d' <i>A. thaliana</i>	166
2.7.	Constructions utilisées pour les transformations transitoires de <i>N. benthamiana</i>	167
2.8.	Constructions utilisées pour les transformations de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	169
2.8.1.	Choix des ARN guides CRISPR-Cas9	169
2.8.2.	Construction des vecteurs CRISPR-Cas9.....	170

3.	Méthodes de transformations génétiques.....	172
3.1.	Transformation stable d' <i>A. thaliana</i> par immersion florale.....	172
3.2.	Transformation transitoire de <i>N. benthamiana</i> par agroinfiltration	173
3.3.	Transformation de <i>P. tricornutum</i> par conjugaison bactérienne et sélection des mutants	174
3.3.1.	Transformation par conjugaison bactérienne	174
3.3.2.	Sélection des transformants.....	175
3.3.3.	Informations sur les mutants obtenus	176
4.	Analyses lipidiques	178
4.1.	Extraction des glycérolipides par la méthode de Folch.....	178
4.2.	Méthanolyse des acides gras.....	179
4.3.	Dosage des acides gras par GC-FID.....	180
4.4.	Séparation et identification des glycérolipides par TLC	180
4.5.	Quantification des glycérolipides par HPLC-MS/MS	181
5.	Analyses des plantes de <i>N. benthamiana</i> transformées de manière transitoire.....	183
5.1.	Observations microscopiques	183
5.1.1.	Microscopie confocale.....	183
5.1.2.	Quantification de la fluorescence	183
5.1.3.	Microscopie électronique à transmission	183
5.2.	Purification des chloroplastes	184
5.3.	Quantification de l'amidon.....	186
5.4.	Analyse de l'activité photosynthétique.....	186
5.5.	Analyses des protéines	187
5.5.1.	Extraction des protéines.....	187
5.5.2.	Dosage des protéines extraites	187
5.5.3.	Migration des protéines sur gel dénaturant SDS-PAGE	188
5.5.4.	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	188
5.5.5.	Immunodétection des protéines (Western Blot)	188

5.5.6. Révélation de la membrane	189
6. Analyses phénotypiques des cellules de <i>P. tricornutum</i>	189
6.1. Suivi de croissance.....	189
6.2. Observations microscopiques	190
7. Présentation des résultats et analyses statistiques	190
Références bibliographiques	193
Résumés.....	217

Abréviations

A

Acétyl-CoA : acétyl-Coenzyme A
ACP : Acyl-Carrier-Protein
ADN : acide désoxyribonucléique
ARA : acide arachidonique
ASQD : acyl-SQDG

B

BL : bétaine lipides
BTA : Betaine Lipid Synthase

C

CCT : Cytidine triphosphate:phosphocholine cytidyltransferase
CDP: cytidine diphosphate
CDP-Cho : CDP-Choline
CDPDS : CDP-DAG synthase
CDS : CDP-diacylglycerol synthase
CEK : choline/éthanolamine kinase
CLS : cardiolipine synthase
Col0 : Columbia-0
CPT : CDP-choline:DAG choline phosphotransférase

D

DAG : diacylglycérol
DGAT : diacylglycérol acyl transférase
DGCC : 1,2-diacylglyceryl-3(1)-O-carboxy-(hydroxyméthyl)-choline
DGD : DGDG synthase
DGDG : digalactosyldiacylglycérol
DGHS : diacylglycérylhomosérine
DGTA : 1(3),2-diacylglyceryl-3(1)-O-2'-(N,N,N-triméthyl)- β -alanine
DGTS : 1(3),2-diacylglyceryl-3(1)-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homosérine
DHA : acide docohexaénoïque
DPG : diphosphatidylglycérol (ou cardiolipine)

E

EPA : acide eicosapentaénoïque
ETR : electron transfer rate

F

FAD : Fatty Acid Desaturase
FAME : esters méthyliques d'acides gras
FAS : Fatty Acid Synthase
FIB-SEM : Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy

G

GC-FID : chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
GDPD : glycérophosphodiester phosphodiesterases
GFP : green fluorescent protein
GPD : glycérophosphodiester
GlcADG : glucuronosyldiacylglycérol

G3P : glycérol-3-phosphate

H

HPLC-MS/MS : chromatographie en phase liquide à haute performance, couplée à de la spectrométrie de masse en tandem

I

InsP : inositol polyphosphates

INDEL : Insertion/Délétion

J

JGI : Joint Genome Institute

L

LAH : lipid acyl hydrolase

LCFAs : acides gras à chaîne longue

LPAAT : acide lysophosphatique acyltransférase

M

MCFAs : acides gras à chaîne moyenne

MGD : MGDG synthase

MGDG : monogalactosyldiacylglycérol

N

N : azote

NPC : phospholipase C non spécifique

NPQ : non-photochemical quenching

P

P : phosphore

PA : acide phosphatidique

PAD : palmitoyl-ACP désaturase

PAH : phosphatidates phosphohydrolase

PAP : phosphatidic acid phosphatase

PC : phosphatidylcholine

PCho : phosphocholine

PDAT : phospholipid:diacylglycerol acyltransferase

PE : phosphatidyléthanolamine

PECT : CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférase

PEMT : phosphatidyléthanolamine-N-méthyltransférase

PEtn : phosphoéthanolamine

PG : phosphatidylglycérol

PGS : phosphatidylglycérol synthase

PHL : phosphate response-like

PHT : specific phosphate transporter

PHR : phosphate response

PI : phosphatidylinositol

Pi : phosphate inorganique

PI-PLC : l'hydrolyse spécifique du PI

PL : phospholipides

PLD : phospholipase D

PMT : Phospho-base N-Methyltransferase

PolyP : polyphosphates
PS : phosphatidylsérine
PSS : PS synthase
PUFAs : acides gras polyinsaturés

Q

QC : contrôle qualité

R

RE : réticulum endoplasmique
RFP : red fluorescent protein

S

SAD : stéaroyl-ACP désaturase
SAM : S-adenosyl-L-Methionine
sgRNA : single guide RNA
SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol
SQD2 : SQDG synthase
STEM : microscopie électronique en transmission par balayage

T

TAG : triacylglycérol
TGD : trigalactosyldiacylglycérol
TLC : chromatographie sur couche mince
TPT : triose-phosphate/phosphate translocator

V

VLCFAs : acides gras à très longue chaîne
VLC-PUFAs : acides gras polyinsaturés à très longue chaîne

W

WT : wild type

Introduction

I. Introduction générale

1. Présentation du sujet d'étude

Au sein de chaque écosystème, les organismes vivants doivent faire face aux variations des conditions de leur environnement. Au cours de l'évolution, ces organismes ont développé des stratégies spécifiques pour s'adapter aux différents stress rencontrés dans leur milieu. La disponibilité en nutriments représente une part importante de ces stress et peut conduire à des changements métaboliques conséquents. Le phosphore (P) est un nutriment essentiel à la croissance de divers organismes tels que les bactéries, les champignons et les plantes. Il est assimilé sous la forme de phosphate inorganique (Pi) et se retrouve souvent limitant dans les écosystèmes aquatiques et terrestres. Le phosphate entre dans la composition de macromolécules essentielles telles que les acides nucléiques, les lipides et les protéines et participe à de nombreuses fonctions cellulaires. Chez les plantes, la carence en phosphate affecte grandement la croissance et le développement, causant ainsi une diminution importante des rendements de production dans le domaine de l'agriculture.

Les plantes soumises à une carence en phosphate mettent en place plusieurs mécanismes visant à stimuler l'absorption du Pi par les racines et mobiliser les réserves de Pi à l'intérieur des cellules. Une part importante du Pi intracellulaire est stockée au niveau d'une classe particulière de glycérolipides appelée les phospholipides, composants majoritaires des membranes extraplastidiales. En situation de carence en Pi, les phospholipides sont dégradés afin de fournir à la cellule de nouvelles sources de Pi utiles à ses fonctions vitales. Les phospholipides dégradés sont alors remplacés par des lipides non phosphatés afin de maintenir la structure et l'intégrité des membranes. Cependant, ce remodelage lipidique est limité et ne permet de recycler qu'une partie des phospholipides des membranes.

Les mécanismes d'adaptation à la carence nutritionnelle sont également présents chez d'autres organismes et notamment chez les microalgues. Ces dernières constituent un groupe très divers d'organismes unicellulaires photosynthétiques vivant en milieu marin ou en eau douce. Confrontées à un environnement constamment variable, les microalgues ont développé des mécanismes d'adaptation très efficaces. La diatomée *Phaeodactylum tricornutum* et les eustigmatophytes du genre *Nannochloropsis* possèdent notamment de hautes capacités de résilience face à la faible disponibilité en Pi et accumulent une grande quantité de lipides dans

cette condition (Abida et al., 2015; Mühlroth et al., 2017). Chez ces organismes, le remodelage lipidique dû à la carence en Pi fait intervenir une autre classe de glycérolipides non phosphatés appelée bétaine lipides (BL). Découverts dans les années 1970, les BL sont des lipides membranaires présents chez divers groupes d'organismes comme les bactéries, les champignons, les algues ou certaines plantes issues de clades primitifs telles que les Bryophytes. Chez les algues, la proportion de BL varie selon les espèces mais il semblerait que leur synthèse soit fortement augmentée en réponse à la carence en Pi pour remplacer les phospholipides dégradés (Murakami et al., 2018; Van Mooy et al., 2009). Ces derniers seraient même intégralement remplacés par les BL chez certaines algues marines soumises à la carence en Pi (Abida et al., 2015; Mühlroth et al., 2017). La présence des BL est ainsi considérée comme un processus adaptatif particulièrement efficace pour l'acclimatation des organismes à leur environnement. Au cours de l'évolution, la synthèse des BL a progressivement diminué jusqu'à être totalement perdue chez les plantes à graines. Au vu du rôle primordial des BL chez les algues, la disparition de ces derniers chez les plantes terrestres soulève des interrogations. Bien qu'ils soient considérés comme de bons substituts aux phospholipides chez les organismes marins, leur impact chez les organismes terrestres pourrait être différent.

Ce projet de thèse s'intéresse aux rôles des BL chez les microalgues et à l'impact de leur production chez les plantes supérieures. L'objectif est de comprendre l'évolution des stratégies d'adaptation de ces organismes à la carence en Pi et d'identifier d'éventuels mécanismes visant à améliorer leur tolérance. L'introduction de ce manuscrit débute par la description des organismes étudiés et des glycérolipides qu'ils produisent. Une seconde partie sera portée sur le rôle du phosphate chez les organismes photosynthétiques et les mécanismes mis en place par ces derniers pour faire face à la carence en Pi. Enfin, une troisième partie présentera une synthèse de données bibliographiques sur le rôle, la formation et la distribution des bétaines lipides chez les organismes.

2. Origines et évolution des organismes photosynthétiques

2.1 L'émergence des eucaryotes photosynthétiques par l'endosymbiose primaire

Les organismes eucaryotes sont caractérisés par la présence de membranes intracellulaires délimitant les différents organites. L'origine de ces organismes est incertaine mais il semble que la première cellule eucaryote ait émergé d'un événement d'endosymbiose au cours duquel une cellule hôte archéenne aurait intégré une α -protéobactérie ancestrale. L'évolution de cette dernière aurait abouti à l'apparition de la mitochondrie (Eme et al., 2017) et se serait établie conjointement à l'acquisition

des composants du noyau (Gray et al., 1999), constituant ainsi les caractères déterminants communs à l'ensemble des eucaryotes. Tout comme la mitochondrie, l'acquisition du chloroplaste constitue un événement majeur dans l'évolution des eucaryotes et découlerait également de l'intégration d'un autre organisme par endosymbiose (Bhattacharya & Medlin, 1995). L'endosymbiose primaire se réfère à la fusion d'une cellule eucaryote et d'une cyanobactérie ancestrale à l'origine de l'apparition du chloroplaste (**Figure 1**). Cette théorie initialement mise en évidence par des observations microscopiques de pigments plastidiaux a été appuyée par de nombreuses études génomiques et phylogénétiques (Archibald & Keeling, 2002; Howe et al., 2008; Turmel, 1999). La similarité génétique entre les gènes plastidiaux et cyanobactériens constitue notamment l'une des preuves les plus évidentes de l'origine endosymbiotique du chloroplaste (Gray & Spencer, 1996). L'ensemble des chloroplastes retrouvés chez les eucaryotes découleraient de cet événement unique d'endosymbiose (Archibald & Keeling, 2002) ayant abouti à l'apparition d'un chloroplaste dit primaire et constitué d'une enveloppe à deux membranes, vestiges de l'enveloppe cyanobactérienne (CAVALIER-SMITH, 1982) (**Figure 1**). Le chloroplaste primaire est considéré comme un organite semi-autonome ; il contient son propre matériel génétique sous forme d'ADN circulaire et dispose ainsi de presque toute la machinerie cellulaire utile à la réplication et à la transcription de ses gènes. Tout comme la mitochondrie, il est déconnecté du système endomembranaire et est indispensable au métabolisme énergétique de la cellule (Maréchal, 2024). Après l'apparition du chloroplaste primaire par endosymbiose, trois grandes lignées ont émergé et celles-ci peuvent se distinguer par la composition en pigments de leur machinerie photosynthétique (**Figure 2**). Les organismes de la lignée verte (ou Viridiplantae) contiennent de la chlorophylle *a* associée à de la chlorophylle *b* et correspondent communément aux algues vertes et aux plantes (Archibald & Keeling, 2002) (**Figure 2**). Les algues *Chlamydomonas reinhardtii* et *Ostreococcus tauri* sont notamment des organismes modèles pour l'étude des algues vertes. Une deuxième lignée appelée la lignée rouge a également émergé pour aboutir à l'apparition des algues rouges (ou Rhodophytes) contenant de la chlorophylle *a* associée aux phycobilines. Enfin, une troisième lignée issue de l'endosymbiose primaire a abouti à l'apparition d'organismes unicellulaires appelés les Glaucophytes et contenant de la chlorophylle *a* associée aux phycocyanines et aux allophycocyanines (Archibald & Keeling, 2002). Ces organismes se distinguent par la présence d'une paroi cellulaire de peptidoglycane entourant le chloroplaste (**Figure 2**).

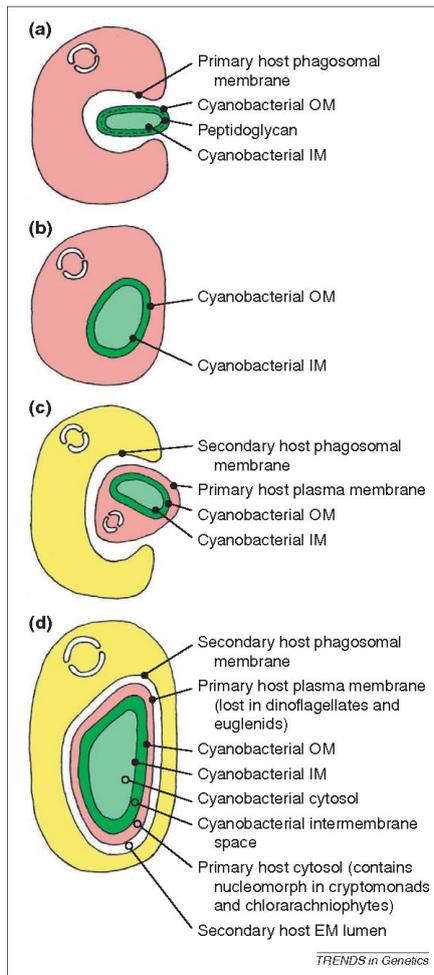


Figure 1. Endosymbiose primaire et secondaire. D'après (Archibald & Keeling, 2002). **(a,b)** Endosymbiose primaire **(a)** entre un eucaryote hétérotrophe (rose) et une cyanobactérie (vert) à l'issue de laquelle un plaste primaire est apparu et la membrane phagosomale de l'hôte a disparu **(b)**. Ce processus a été suivi par la diversification des Glaucophytes, des algues rouges et des algues vertes (incluant les plantes). Chez les algues rouges et vertes, la paroi de peptidoglycane cyanobactérienne a été perdue. **(c,d)** Endosymbiose secondaire **(c)** entre un second hétérotrophe eucaryote (jaune) et une algue primaire (rose avec le plaste vert) à l'issue de laquelle un plaste secondaire est apparu **(d)**. Ce processus a contribué à l'apparition d'une grande diversité de groupes d'algues photosynthétiques. Toutes les membranes des plastes primaire et secondaire ainsi que leur origine sont indiquées. L'origine des compartiments cellulaires résultant de l'endosymbiose secondaire sont également indiqués. **EM**, endomembrane; **IM**, inner membrane (membrane interne); **OM**, outer membrane (membrane externe).

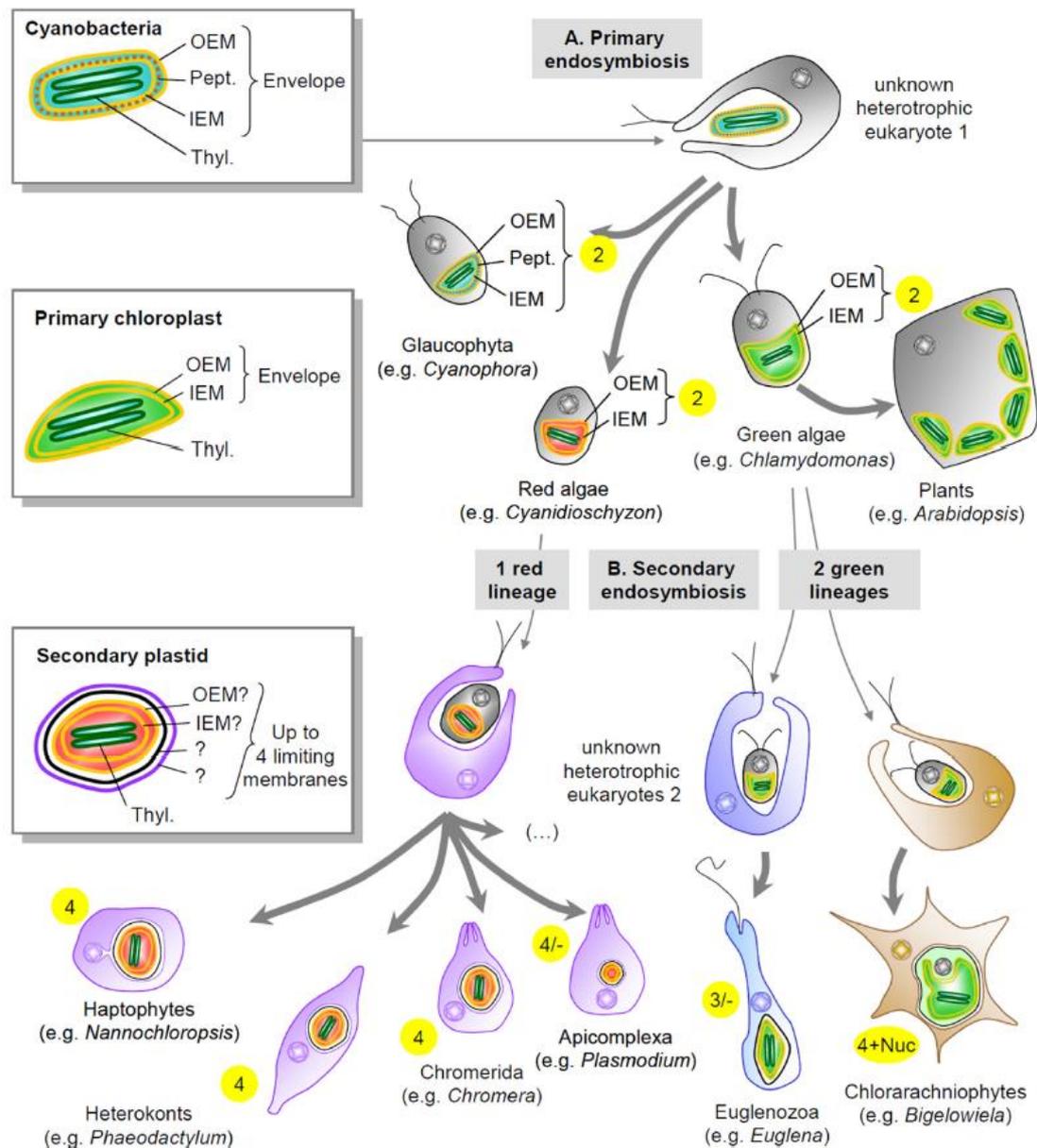


Figure 2. Représentation schématique de l'évolution des plastes. D'après (Petroutsos *et al.*, 2014). (A) Endosymbiose primaire. Trois lignées distinctes découlent de l'endosymbiose primaire : les Glaucophytes, la lignée « rouge » et la lignée « verte ». Ces organismes possèdent un chloroplaste primaire (panel de gauche) délimitée par deux membranes (lignes jaunes). (B) Endosymbiose secondaire. L'endosymbiose d'algues vertes a donné lieu à l'apparition des Euglénozoaires et des Chlorarachniophytes, tandis que l'endosymbiose d'une algue a conduit à l'émergence d'une grande diversité d'algues appelées communément les algues brunes (cellules violettes). Les nombres en jaune indiquent le nombre de membranes autour du chloroplaste (de 2 à 4). Les phylums qui incluent des espèces qui ont perdu leurs plastes sont indiqués par 3/- et 4/-. Enfin, les phylums dans lesquels le noyau primaire a été conservé en tant que nucléomorphe sont indiqués par 4+Nuc. OEM, membrane de l'enveloppe externe; Pept., peptidoglycane ; IEM, membrane de l'enveloppe interne; Thyl., thylakoïde.

2.2 L'évolution de la lignée verte

A l'issue de l'endosymbiose primaire, les organismes de la lignée verte se sont diversifiés et ont grandement contribué à l'évolution des écosystèmes marins et terrestres (De Clerck et al., 2018). Trois principaux branchements sont apparus : les Prasinodermophytes et les Chlorophytes, deux groupes d'algues vertes vivant principalement en milieu aquatique (marin ou d'eau douce), et les Streptophytes, comprenant des algues vertes (Charophytes) mais également l'ensemble des plantes terrestres (ou Embryophytes) (**Figure 3**) (Zhang et al., 2022). Le passage à la pluricellularité serait apparu de manière indépendante dans plusieurs clades de Streptophytes bien avant leur établissement sur les terres (De Clerck et al., 2018). La colonisation de l'environnement terrestre par les plantes a constitué une avancée majeure dans l'évolution des organismes et a grandement contribué à la diversification des sols et de la faune terrestre (Parnell & Foster, 2012). Au cours de cette colonisation, de multiples changements morphologiques, physiologiques et biochimiques ont permis aux plantes de s'adapter à l'environnement terrestre. La vascularisation et l'apparition de nouvelles voies métaboliques conduisant à la production de métabolites spécialisés et de polymères structuraux figurent notamment parmi ces adaptations. Les modes de reproduction ont également subi de profonds changements avec l'émergence des plantes à graines qui constituent aujourd'hui le groupe de plantes le plus diversifié sur terre (Zhang et al., 2022). Outre ces différentes innovations adaptatives, l'évolution des végétaux a également été marquée par la perte de certains caractères tels que la tolérance à la dessiccation, c'est-à-dire la capacité des organismes à se réhydrater après une perte importante de l'eau contenue dans leur cellule (Oliver et al., 2000). Ce caractère serait initialement présent chez les Bryophytes, le clade de plantes terrestres le plus basal sur le plan évolutif, et aurait été perdu au cours de l'évolution. Si la tolérance à la dessiccation a été primordiale pour la colonisation de l'environnement terrestre par les plantes primitives issues du milieu aquatique, cette capacité aurait à terme constitué un coût métabolique trop important, freinant ainsi l'évolution des plantes vasculaires. La perte de la tolérance à la dessiccation aurait donc été favorisée conjointement à la complexification du système vasculaire chez les Trachéophytes, un processus visant à internaliser les flux d'eau et à protéger la plante des pertes hydriques (Oliver et al., 2000). La tolérance à la dessiccation a néanmoins subsisté pour certains stades développementaux particuliers des plantes comme le pollen ou les spores. Chez les Angiospermes et les Gymnospermes, la graine constitue également un exemple d'organe hautement tolérant à la dessiccation.

Comme évoqué précédemment, les Angiospermes constituent le groupe de plantes dominant largement l'écosystème terrestre en terme de diversité. En biologie végétale, la plante modèle *Arabidopsis thaliana* de la famille des Brassicacées est couramment utilisée pour étudier le métabolisme et le développement des plantes. Son génome a été entièrement séquencé (The

Arabidopsis Genome Initiative, 2000) et plusieurs banques de données génétiques et protéomiques ont été créés. Les méthodes de transformation génétique ont également été développées sur cet organisme et permettent d'étudier en routine les fonctions des gènes. Etant issue de la lignée verte, *A. thaliana* peut être utilisée par analogie pour comprendre les processus biologiques d'autres organismes contenant des chloroplastes primaires comme les algues vertes.

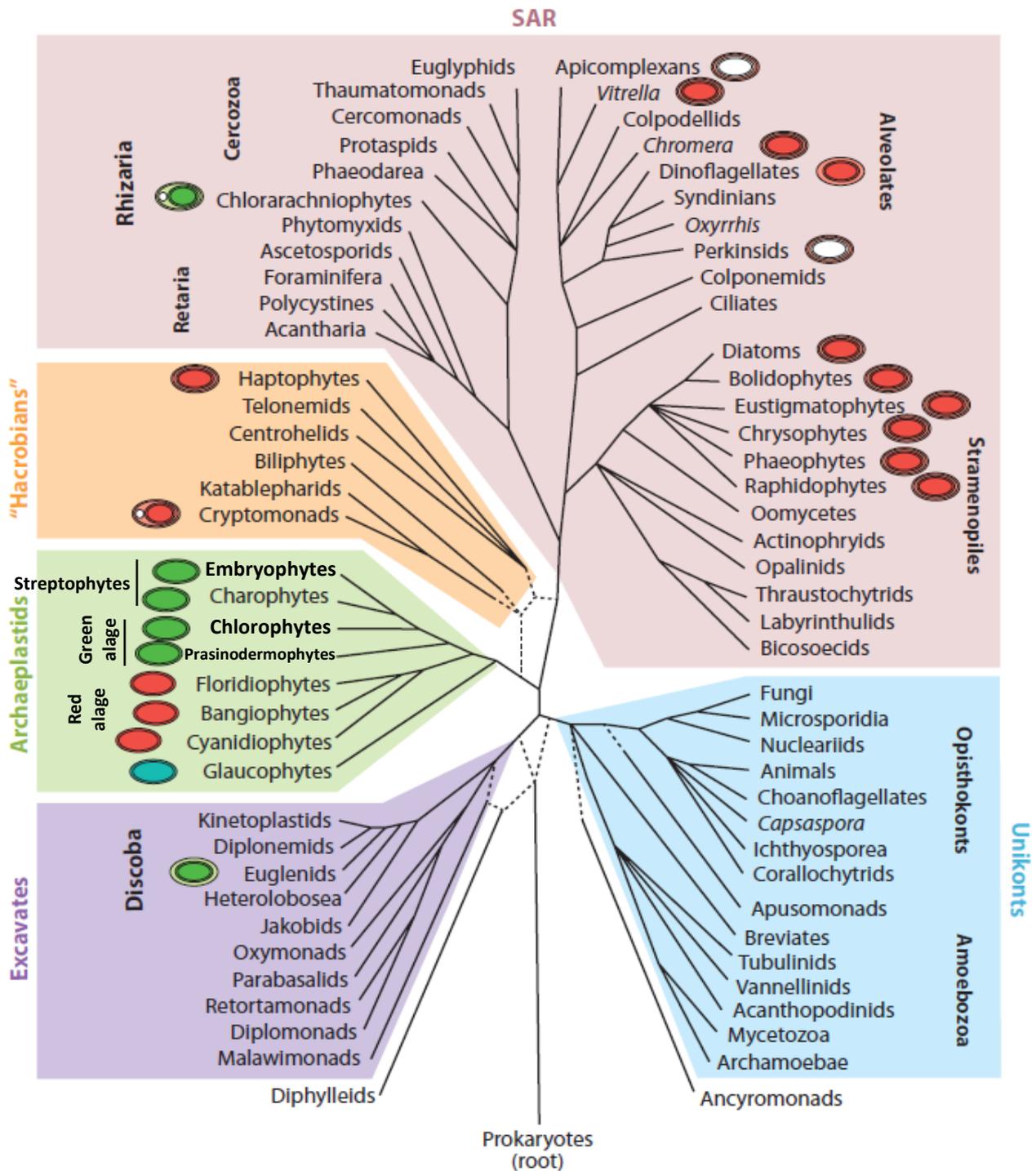


Figure 3. Arbre des eucaryotes et répartition des plastes, adapté de (Keeling, 2013). Cet arbre regroupe les relations entre les principales lignées eucaryotes et découle d'une synthèse de nombreuses études basées sur de larges analyses phylogénomiques. Les lignes pointillées indiquent les relations particulièrement controversées et dans certains cas, deux possibilités conflictuelles sont montrées. Les boîtes colorées représentent les

supergroupes, y compris les Hacrobianes qui sont contestés mais tout de même indiqués parce qu'il n'y a pas encore d'alternative confirmée. Les Chromalvéolates seraient équivalents aux groupes « Hacrobianes » et SAR (Straménopiles-Alvéolates-Rhizaires) combinés. La structure membranaire et l'origine des plastes (lorsqu'elles sont connues) sont indiquées en périphérie. Les plastes primaires avec deux membranes se trouvent dans les Archaeplastidae (vert, rouge et cyan). Les plastes secondaires se trouvent dans les organismes SAR, les Cryptomonades et les Haptophytes, ainsi que dans les Euglénozoaires. Les plastes secondaires indiquent le nombre de membranes et la présence éventuelle de nucléomorphes (noyau vestigial entre les paires de membranes interne et externe du plaste), et la couleur indique s'ils sont dérivés de l'endosymbiose d'algues vertes ou rouges. Les plastes des Apicomplexes et des Perkinsides sont dérivés d'une algue rouge, mais ils sont représentés en blanc pour indiquer qu'ils sont désormais tous non photosynthétiques.

2.3 L'évolution des organismes photosynthétiques issus de l'endosymbiose secondaire

Comme évoqué précédemment, les algues rouges et vertes, les plantes terrestres et les Glaucophytes ont conservé durant l'évolution leur chloroplaste primaire constitué de deux membranes. Les eucaryotes photosynthétiques n'appartenant pas aux groupes précédemment cités découleraient quant à eux d'un deuxième événement d'endosymbiose aboutissant à l'apparition d'un chloroplaste dit secondaire et constitué de trois ou quatre membranes (**Figure 2**) (Archibald & Keeling, 2002). L'endosymbiose secondaire se réfère à l'intégration d'une cellule issue de l'endosymbiose primaire par une autre cellule eucaryote hétérotrophe. Le chloroplaste primaire aurait été conservé avec des membranes additionnelles issues de la membrane plasmique de l'endosymbionte et de la membrane phagosomale de la cellule hôte (**Figure 1**) (Archibald & Keeling, 2002). L'endosymbiose secondaire a ainsi contribué à l'apparition d'une très grande diversité d'algues photosynthétiques résultant de l'évolution complexe des plastes (**Figure 3**). Plusieurs lignées ont émergé de cet événement. Une endosymbiose d'algues vertes a donné naissance aux Euglénozoaires et aux Chlorarachniophytes, contenant respectivement un plaste délimité par trois et quatre membranes. Parallèlement, une endosymbiose d'algue rouge a conduit à l'émergence de groupes d'algues très divers appelés communément les algues brunes et comprenant notamment les organismes SAR (Straménopiles, Alvéolates et Rhizaires) (**Figure 2**). Parmi ces algues brunes, les Haptophytes, les Straménopiles et les Cryptomonades (**Figure 3**) se distinguent par la présence d'une quatrième membrane chloroplastique en continuité physique avec les membranes du réticulum endoplasmique (RE) et du noyau (Archibald & Keeling, 2002). Ces groupes comprennent un grand nombre d'organismes couramment étudiés pour l'étude des microalgues, telle que l'Haptophyte *Emiliana huxleyi* ou les algues du genre *Cryptomonas*. Les Straménopiles (ou Hétérocontes) constituent également un groupe très étudié et comprends plusieurs microalgues modèles telles que la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* et les Eustigmatophytes du genre *Nannochloropsis* telles que *Microchloropsis gaditana*.

2.4 Les microalgues : des organismes d'intérêt majeur

Le terme de microalgue se réfère à l'ensemble des organismes eucaryotes unicellulaires et photosynthétiques. Comme évoqué précédemment, les microalgues forment un groupe très diversifié et peuvent se retrouver dans différents clades selon leur origine endosymbiotique, comme les SAR, les Chlorophytes ou encore les Haptophytes (**Figure 3**). Elles se répartissent dans l'ensemble des milieux aquatiques (océans et eaux douces) mais également sur certaines surfaces terrestres telles que les roches, les sols humides ou les environnements extrêmes. Les microalgues sont d'une importance capitale pour les écosystèmes, en particulier les microalgues marines telles que les Straménopiles photosynthétiques. Ces organismes jouent un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques et notamment celui du carbone (Falkowski et al., 1998). Ils font partie d'une grande communauté de microorganismes marins appelée le phytoplancton eucaryotique, dont les diatomées représentent une composante significative. Ces dernières seraient responsables d'environ un cinquième de la photosynthèse réalisée sur terre, générant chaque année autant de carbone organique que l'ensemble des forêts tropicales terrestres (Nelson et al., 1995). Ces organismes représentent ainsi une source majeure de matière organique et contribuent à la production primaire marine à hauteur d'environ 40% (Scala & Bowler, 2001).

Les microalgues marines suscitent un intérêt croissant dans le domaine des biotechnologies. Les microalgues dites oléagineuses sont notamment capables de produire une grande quantité de lipides neutres exploitables pour l'obtention de biocarburants (Gilmour, 2019). Les Eustigmatophytes du genre *Nannochloropsis* ont en effet été étudiées pour leur capacité à produire des quantités importantes de triacylglycérols (TAG) (Rodolfi et al., 2009), ces derniers pouvant représenter jusqu'à 60% de leur biomasse sous certaines conditions (Jia et al., 2015). Les microalgues produisent également des composés à haute valeur ajoutée dans le domaine de l'alimentation et de la santé. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 et oméga-6 (ω 3- et ω 6-PUFA) sont en effet principalement fournis par les microalgues marines et sont d'une importance capitale dans la chaîne alimentaire (Jónasdóttir, 2019). Ces acides gras essentiels sont hautement bénéfiques pour la santé humaine et peuvent être directement extraits des microalgues au lieu d'être prélevés chez les poissons, réduisant ainsi l'impact environnemental de la pisciculture. Les microalgues marines *Phaeodactylum tricornutum* et *Microchloropsis gaditana* figurent notamment parmi les espèces riches en acides gras ω 3 valorisés tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5) (Jouhet et al., 2017; Zou et al., 2000). Elles suscitent donc un intérêt majeur dans l'industrie (Spolaore et al., 2006) et peuvent être modifiées génétiquement pour accroître le rendement de production de ces composés. Une souche modifiée de *Phaeodactylum tricornutum* a notamment été générée en vue d'optimiser la synthèse d'EPA et d'acide docohexaénoïque (DHA, 22:6), un autre acide gras ω 3 hautement valorisé (Hamilton et al., 2015). Les

microalgues peuvent également être utilisées pour la production d'autres composés d'intérêts tels que les caroténoïdes (Yaakob et al., 2015) ou les polysaccharides (Chew et al., 2017; Sheehan et al., 2012).

3. Les glycérolipides, composants majoritaires des membranes cellulaires

Cette partie aborde la description, la synthèse et le rôle des différentes classes de glycérolipides chez les organismes photosynthétiques. Les connaissances du métabolisme lipidique chez les plantes sont généralement basées sur l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana*. Le métabolisme lipidique des algues reste moins exploré et est souvent inféré à partir de celui des plantes pour lequel les mécanismes sont mieux compris et caractérisés.

3.1 Généralités sur les glycérolipides

Les glycérolipides forment une classe prédominante de lipides et jouent un rôle essentiel dans la formation et la structure des membranes cellulaires. Chez les plantes, les glycérolipides peuvent être divisés en trois principaux groupes : les phospholipides (PL), les glycolipides (aussi appelés galactoglycérolipides) et les triacylglycérols (TAG). Un quatrième groupe de glycérolipides appelé bêtaines lipides (BL) peut être retrouvé chez certaines plantes issues de clades ancestraux tels que les Bryophytes ou les Ptéridophytes, bien que leur principale répartition se trouve chez les algues. La composition en glycérolipides est spécifique à chaque membrane cellulaire. Chez les organismes photosynthétiques, les phospholipides et les bêtaines lipides sont majoritairement retrouvés au niveau des membranes extraplastidiales tandis que les galactoglycérolipides composent les membranes chloroplastiques. Les TAG s'organisent quant à eux sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytosol et ne rentrent donc pas dans la composition des membranes biologiques. Les glycérolipides membranaires contribuent grandement au maintien de la structure des membranes cellulaires. Ces dernières ont des propriétés biophysiques particulières et cela est en grande partie dû à leur composition en glycérolipides (Bolik et al., 2023; Jouhet, 2013; Kanduc et al., 2017).

Les glycérolipides sont caractérisés par une structure commune composée d'un squelette glycérol sur lequel un, deux ou trois acides gras sont estérifiés (**Figure 4**). Les glycérolipides contenant deux acides gras (diglycérides) sont les constituants principaux des membranes cellulaires. Ces molécules peuvent contenir un seul acide gras (lysolipide) suivant leur stade de synthèse ou de dégradation (**Figure 4B et C**). Les glycérolipides membranaires sont caractérisés par la présence d'une tête polaire hydrophile et d'acides gras hydrophobes. Au sein des membranes cellulaires constituées de deux feuilletts, les chaînes d'acides gras sont dirigées vers l'intérieur et forment un environnement hydrophobe permettant de séparer la cellule ou l'organite de l'environnement extérieur. Les têtes polaires, quant

à elles, sont orientées vers l'extérieur de la bicouche et sont en contact avec l'eau environnante (**Figure 4D**).

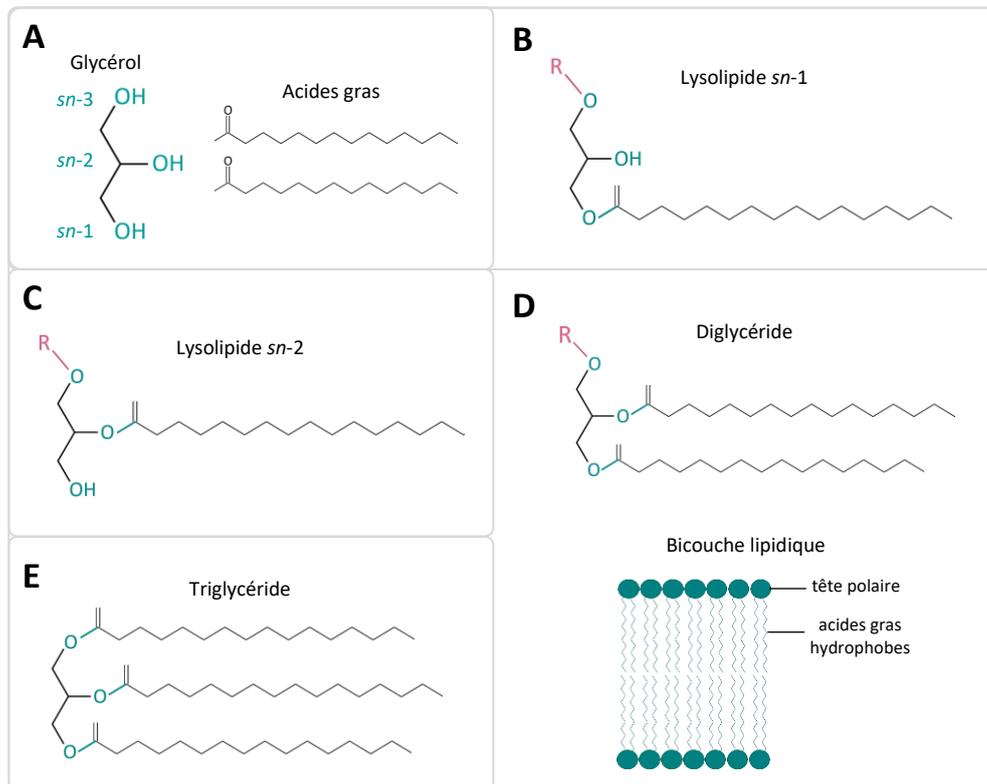


Figure 4. Structure des glycérolipides. (A) Structures communes aux glycérolipides. Les glycérolipides sont composés d'un squelette glycérol (avec les positions *sn*-1, *sn*-2 et *sn*-3) et d'acides gras (exemples à 14 carbones). (B,C) Structure d'un lysolipide sur lequel est estérifié un seul acide gras en position *sn*-1 (A) ou *sn*-2 (B). (D) Structure d'un diglycéride sur lequel deux acides gras sont estérifiés en position *sn*-1 et *sn*-2. Ces diglycérides peuvent s'organiser en bicouche lipidique, avec les acides gras hydrophobes orientés vers l'intérieur et les têtes polaires hydrophiles orientées vers l'extérieur. (E) Structure d'un triglycéride sur lequel trois acides gras sont estérifiés. Les liaisons ester sont indiquées par des lignes bleues. R, radical (tête polaire).

Les glycérolipides membranaires se divisent en différentes classes suivant la composition chimique de leur tête polaire : les phospholipides contiennent un groupement phosphate, les glyco glycérolipides contiennent des sucres et les bêtaines lipides contiennent un dérivé d'acide hydroxyaminé. La synthèse et les rôles de ces trois classes de glycérolipides sont détaillées dans les parties suivantes.

3.2 Les acides gras

3.2.1 Structure, nomenclature et propriétés des acides gras

Les acides gras sont composés d'une chaîne hydrocarbonée dotée d'un groupement carboxyle (-COOH) en position terminale (**Figure 5**). Au niveau des glycérolipides des organismes photosynthétiques, la longueur de cette chaîne varie principalement de 14 à 24 carbones. Les acides gras à 14 carbones sont

considérés comme des acides gras à chaîne moyenne (MCFAs), ceux contenant 16 à 20 carbones sont considérés comme des acides gras à chaîne longue (LCFAs) tandis que les acides gras de plus de 22 carbones sont appelés acides gras à très longue chaîne (VLCFAs) (Reszczyńska & Hanaka, 2020). Les acides gras à 16 et 18 carbones sont majoritairement retrouvés chez les plantes tandis que les algues contiennent généralement un plus large panel incluant les acides gras à moyenne, longue et très longue chaîne. Les acides gras peuvent également se différencier par la présence d'insaturations sur leur chaîne carbonée lorsque deux carbones adjacents sont liés par une double liaison. Ils sont alors décrits comme insaturés : mono-insaturés lorsqu'une seule insaturation est présente et polyinsaturés lorsque deux à six insaturations marquent la chaîne carbonée (**Figure 5**). Dans la nomenclature des acides gras, le nombre d'atomes de carbone composant la chaîne est indiqué en premier et est suivi par le nombre d'insaturations. La position des insaturations est également indiquée selon la numération Δ ou ω (**Figure 5A**).

Les insaturations des acides gras peuvent être de deux types : les insaturations *trans* n'ont pas d'effet sur la courbure de la chaîne carbonée (**Figure 5C**) tandis que les insaturations *cis* génèrent un angle de 30° (**Figure 5D et C**) (Hyyönen et al., 1997). Le degré d'insaturations ainsi que la longueur de la chaîne carbonée ont une influence sur les propriétés biophysiques des membranes (Maulucci et al., 2016). A température ambiante, les acides gras saturés et *trans*-insaturés forment une phase gel dans laquelle les chaînes carbonées sont ordonnées et cristallisées, générant ainsi de la rigidité à la membrane (**Figure 5F**). Les acides gras *cis*-insaturés, quant à eux, s'organisent en une phase fluide dans laquelle les chaînes carbonées sont désordonnées et confèrent plus de fluidité à la membrane (Koynova & Tenchov, 2008). Une phase intermédiaire dite ondulée peut également apparaître (**Figure 5F**). Ces différents états de la bicouche sont influencés par la température de transition de phase des acides gras ; température à laquelle un acide gras cristallisé passe à un état fluide. La température de transition de phase est influencée par la longueur de chaîne des acides gras ainsi que leur degré d'insaturation (Koynova & Tenchov, 2008). La composition de la tête polaire du lipide contenant ces acides gras a également une influence sur ce paramètre. La configuration *cis* des chaînes d'acide gras génère un espacement plus large entre les lipides et augmente ainsi la perméabilité de la membrane (de Mendoza & Pilon, 2019). Chez les organismes photosynthétiques, les acides gras saturés et *cis*-insaturés sont majoritaires. La configuration *trans* n'est observée que dans un seul acide gras spécifique, le 16:1 Δ 3, contenu dans le phosphatidylglycérol (PG) au niveau des membranes chloroplastiques (Dubacq & Trémolières, 1983). La présence de cet acide gras *trans* jouerait un rôle dans la formation et la stabilisation de la machinerie photosynthétique des membranes des thylakoïdes (Dubertret et al., 2002).

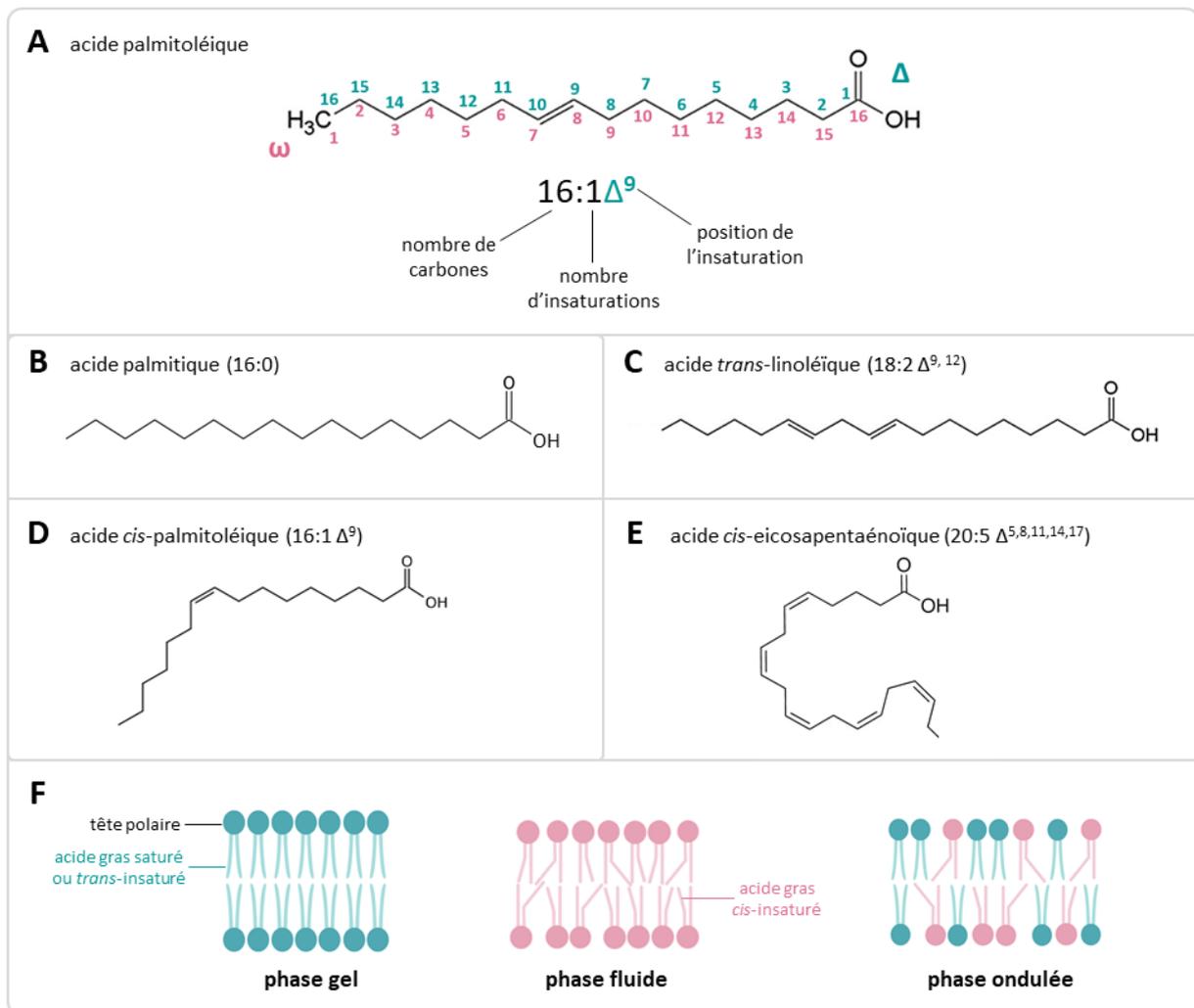


Figure 5. Les acides gras : nomenclature, exemples et propriétés. (A) Numérotation des acides gras, exemple de l'acide palmitoléique. Les carbones sont numérotés depuis l'extrémité $-\text{COOH}$ (Δ , bleu) ou $-\text{CH}_3$ (ω , rose) (B,C,D,E) Structures de l'acide palmitique (B), *trans*-linoléique (C), *cis*-palmitoléique (D) et *cis*-eicosapentaénoïque (E). (A) acide gras saturé. (C,D,E) Acides gras insaturés. (C) Acide gras *trans*-insaturé. (D,E) Acides gras *cis*-insaturés. (F) Représentation schématique de bicouches lipidiques composées uniquement de lipides saturés (ou *trans*-insaturés) (gauche), de lipides *cis*-insaturés (centre) ou d'un mélange de lipides saturés et insaturés (droite).

Outre la fluidité membranaire, la nature des acides gras influence d'autres paramètres de la membrane tels que son épaisseur, sa souplesse, son comportement vis-à-vis de l'eau ou encore ses interactions avec ses constituants protéiques. Les acides gras polyinsaturés permettraient notamment aux membranes d'adopter des conformations plus arrondies ; ces dernières étant nécessaires à la formation de l'enveloppe des vésicules ou des organelles (Harayama & Shimizu, 2020; Tixier-Vidal et al., 1986). Cette conformation spécifique de la membrane est généralement due à une distribution asymétrique des chaînes d'acides gras au sein de la bicouche. Les acides gras polyinsaturés sont enrichis au niveau du feuillet externe de l'enveloppe tandis que le feuillet interne est composé en plus

grande partie de chaînes saturées ou mono-insaturées, permettant ainsi la courbure de l'enveloppe (Harayama & Shimizu, 2020).

La composition en acides gras est également spécifique à chaque organisme. Les acides oléique (18:1) et linoléique (18:3) sont majoritaires chez *A. thaliana* et représentent respectivement 26,2 et 38,2 % des acides gras totaux synthétisés (Jouhet et al., 2017)(Figure 6). Chez les microalgues marines telles que *P. tricornutum* et *M. gaditana*, les acides gras polyinsaturés à très longue chaîne (VLC-PUFAs) sont retrouvés en grande quantité. L'EPA (20:5)(Figure 5E) figure notamment parmi les VLC-PUFAs les plus représentés et peut constituer jusqu'à 30% des acides gras totaux produits chez ces organismes (Jouhet et al., 2017)(Figure 6).

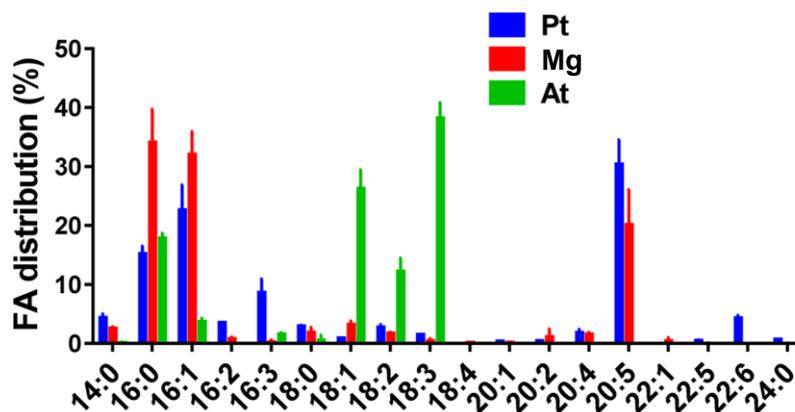


Figure 6. Distribution des acides gras totaux produits par *P. tricornutum* (Pt), *M. gaditana* (Mg) et *A. thaliana* (At). D'après (Jouhet et al., 2018).

3.2.2 Synthèse et devenir des acides gras chez les organismes photosynthétiques

La synthèse et le trafic intracellulaire des acides gras sont essentiels à la formation des glycérolipides membranaires. La signature en acides gras de ces lipides est révélatrice de leur voie de synthèse et permet ainsi de comprendre leur origine et leur cheminement à travers les différents compartiments cellulaires. Chez l'ensemble des organismes photosynthétiques, la synthèse *de novo* des acides gras a lieu dans le stroma du chloroplaste (Li-Beisson et al., 2019). Elle est réalisée à partir de pyruvate ; ce dernier est converti dans le stroma en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA), à son tour converti en Malonyl-CoA puis en Malonyl-ACP (Malonyl-Acyl-Carrier-Protein) (Figure 7A). Le Malonyl-CoA est ensuite pris en charge par le complexe FAS (Fatty Acid Synthase), un ensemble de quatre enzymes responsable de la formation d'un acide gras de six carbones lié à la protéine ACP (C6-ACP). Chez la plupart des organismes, sept cycles de réactions sont réalisés par le complexe FAS et aboutissent à la formation de C16:0-ACP. A chaque cycle, l'acétyl-CoA est utilisé comme unité élémentaire pour allonger la chaîne

de l'acide gras de deux carbones. Chez les plantes, un cycle supplémentaire peut s'effectuer et générer du C18:0-ACP. Chez *A. thaliana*, le C18:0-ACP libéré par le complexe FAS peut également être directement désaturé en C18:1-ACP par une stéaroyl-ACP désaturase (SAD) (Shanklin & Somerville, 1991). Les deux acides gras majoritaires qui sortent du chloroplaste d'*A. thaliana* sont donc le 16:0 et le 18:1. Chez les microalgues marines telles que *P. tricornutum*, seul le C16-ACP est libéré par le complexe FAS. Il peut aussi être désaturé directement en C16:1 ACP par une palmitoyl-ACP désaturase (PAD) (Smith et al., 2021) (**Figure 7B**). Les deux acides gras majoritaires qui sortent du chloroplaste de *P. tricornutum* sont donc le 16:0 et le 16:1.

A l'issue de la formation des molécules d'acyl-ACP par le complexe FAS, deux voies distinctes entrent en jeu pour la prise en charge des acides gras. Au niveau du chloroplaste, les acides gras peuvent être directement estérifiés sur un squelette glycérol-3-phosphate pour contribuer à la synthèse des glycérolipides plastidiaux ; à savoir le phosphatidylglycérol (PG) et les glyco glycérolipides. Les acides gras peuvent également être exportés au niveau du réticulum endoplasmique (RE) pour participer à la synthèse des glycérolipides extraplastidiaux tels que les phospholipides, les TAG et éventuellement les bétaines lipides (**Figure 7**).

Chez les plantes, la voie de prise en charge des acides gras au niveau du chloroplaste est qualifiée de « procaryotique » tandis que celle qui se déroule dans le RE est appelée « voie eucaryotique ». Concernant la voie procaryotique, deux molécules d'acyl-ACP (16:0, 18:0 ou 18:1) sont estérifiées sur un squelette glycérol-3-phosphate par l'action successive de l'acyl-ACP/glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT, ou ATS1) et de l'acyl-ACP/acide lysophosphatique acyltransférase (LPAAT, ou ATS2) (Kang et al., 2020). Ces réactions aboutissent à la formation d'acide phosphatidique (PA) au niveau de l'enveloppe du chloroplaste, généralement composé d'un acide gras 18:1 en position *sn*-1 et 16:0 en position *sn*-2 (PA 18:1/16:0)(FRENTZEN et al., 1983). Le groupement phosphate du PA est ensuite éliminé par la phosphatidic acid phosphatase (PAP), générant ainsi du diacylglycérol (DAG). Le DAG sert alors de plateforme pour la synthèse des glyco glycérolipides plastidiaux. Ces derniers portent la signature spécifique des lipides de la voie procaryotique, à savoir un acide gras C16 en position *sn*-2 (**Figure 7A**). Concernant la voie eucaryotique, les acides gras libres transférés au RE sont également intégrés dans un squelette glycérol-3-phosphate, lequel est ensuite converti successivement en lyso-PA, en PA, puis en DAG. Les glycérolipides découlant de cette voie portent alors la signature eucaryotique C18 en position *sn*-2 et C16 ou C18 en position *sn*-1 (FRENTZEN et al., 1983)(**Figure 7A**). Chez *A. thaliana*, la signature eucaryotique peut également se retrouver au niveau des lipides du chloroplaste. Le squelette DAG dérivé des glycérolipides synthétisés dans le RE serait transféré par un mécanisme inconnu à l'enveloppe du chloroplaste pour apporter des acides gras en C18 (**Figure 7A**).

Ce transport serait effectué par la protéine trigalactosyldiacylglycérol (TGD)(Xu et al., 2010) mais une incertitude subsiste quant à la nature du lipide transféré (PA, DAG ou PC)(Block & Jouhet, 2015).

Chez les microalgues marines telles que *P. tricornutum*, les molécules de C16-ACP produites dans le plaste sont incorporées sur un squelette glycérol-3-phosphate, lequel est ensuite converti en lyso-PA, en PA, puis en DAG. Une à quatre insaturations peuvent être réalisées sur les acides gras, principalement sur ceux estérifiés en position *sn*-2 (Abida et al., 2015). Les lipides plastidiaux découlant de cette voie portent ainsi la signature C16 sur les deux positions du squelette glycérol (Dolch & Maréchal, 2015)(**Figure 7B**). Les acides gras libres en C16 peuvent également être exportés vers le RE pour subir plusieurs étapes d'élongations et de désaturations. Ces derniers sont désaturés en 16:1-CoA ou converti en 18:0-CoA puis en 18:1-CoA. Le 16:1 et le 18:1 peuvent alors être estérifié sur un squelette glycérol-3-phosphate au niveau du RE, générant successivement des molécules de PA puis de DAG. Le DAG sert ensuite de plateforme à la synthèse des lipides extraplastidiaux ; ces derniers sont la cible de plusieurs désaturases qui génèrent des acides gras portant jusqu'à quatre insaturations. Ces derniers sont alors utilisés comme précurseurs pour la formation de VLC-PUFAs tels que le 20:4 (acide arachidonique, ARA) et le 20:5 (EPA) (Billey et al., 2021; Guéguen, 2022). Une dernière étape d'élongation et/ou de désaturation peut aboutir à la formation de 22:5 (acide docosapentaénoïque, DPA) ou de 22:6 (DHA), bien que ces réactions soient minoritaires. L'EPA reste largement majoritaire au niveau des glycérolipides de *P. tricornutum* (Abida et al., 2015). Cet acide gras est également retrouvé au niveau des lipides plastidiaux en position *sn*-1, signe d'un éventuel transport depuis le RE jusqu'à l'enveloppe du plaste par un mécanisme peu connu appelé la voie oméga (voie ω) (Petroutsos et al., 2014) (**Figure 7B**). L'EPA serait fourni par la PC et le DGTA produits dans le RE (Smith et al., 2021) mais la nature de la molécule transférée (glycérolipide, DAG ou acide gras libre) reste encore inconnue.

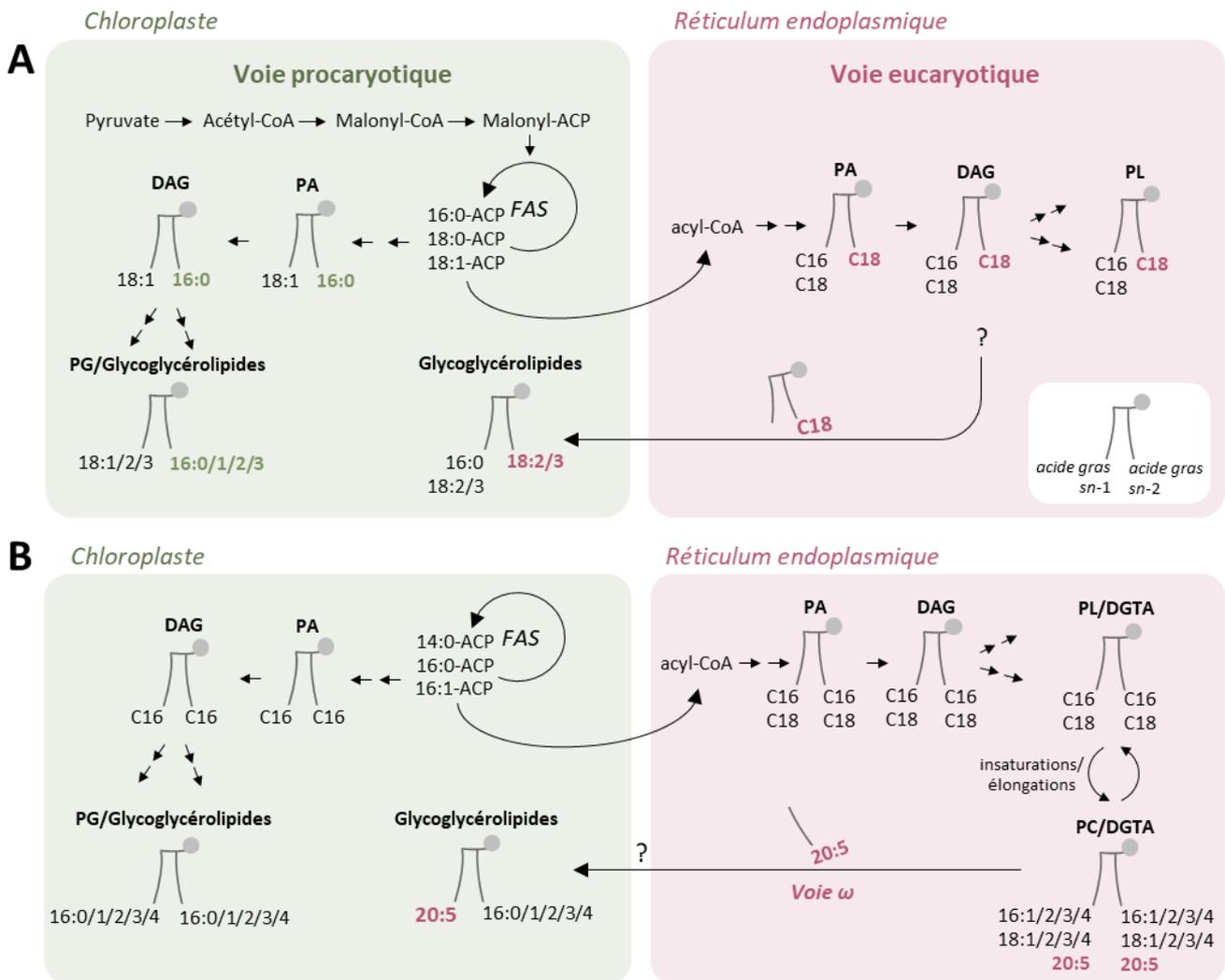


Figure 7. Représentation simplifiée de la synthèse et du devenir des acides gras chez deux organismes photosynthétiques. (A) Synthèse et devenir des acides gras chez la plante modèle *A. thaliana* suivant les voies procaryotique et eucaryotique. La voie procaryotique prend place au niveau du chloroplaste. Le complexe enzymatique FAS génère des molécules d'acyl-ACP qui peuvent être estérifiées sur des squelettes glycérol servant à la synthèse des glycérolipides plastidiaux (voie procaryotique). Les acyl-ACP peuvent également être exportés (sous forme d'acide gras libre) vers le réticulum endoplasmique (RE) dans lequel ils sont liés au Coenzyme A (CoA). Les acides gras sont ensuite estérifiés sur un squelette glycérol servant à la synthèse des glycérolipides extraplastidiaux. Un mécanisme peut également réimporter les acides gras C18 vers le chloroplaste pour être intégrés aux galactoglycérolipides (voie eucaryotique). Les signatures procaryotique et eucaryotique des acides gras sont représentés respectivement en vert et en rose. (B) Devenir des acides gras chez la microalgue marine *P. tricornutum*. Le 20:5 synthétisé dans le RE (rose) est éventuellement transporté vers le plaste par un mécanisme inconnu appelé la voie ω. La désaturation en 22:5 et 22:6, minoritaire chez *P. tricornutum*, n'est pas représentée.

Les doubles flèches indiquent plusieurs réactions successives. **FAS**, Fatty Acid Synthase; **ACP**, Acyl-Carrier-Protein; **PA**, phosphatidic acid; **DAG**, diacylglycérol; **PL**, phospholipides; **TAG**, triacylglycérol; **DGTA**, 1(3),2-diacylglyceryl-3(1)-O-2'-(N,N,N-triméthyl)-β-alanine; **PG**, phosphatidylglycérol.

3.3 Les phospholipides

3.3.1 Description

Les phospholipides sont caractérisés par la présence d'un groupement phosphate (portant une charge négative) au niveau de leur tête polaire, en position *sn*-3 du squelette glycérol. Chez les plantes, ces lipides sont répartis en sept classes : l'acide phosphatidique (PA), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylcholine (PC), le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI) et la cardiolipine (ou diphosphatidylglycérol, DPG) (**Figure 8**). Les phospholipides sont les constituants majoritaires des membranes extraplastidiales, bien que des proportions plus ou moins importantes de PC, de PG et de PI soient également retrouvées dans les membranes chloroplastiques (Block et al., 2007). La PC et la PE sont les phospholipides les plus abondants dans les cellules ; ils représentent en moyenne 50 % des phospholipides totaux et jouent donc un rôle majoritaire dans la structure et la fonction des membranes (Gibellini & Smith, 2010). Chez les plantes, les phospholipides ont également été étudiés pour leur rôle dans la régulation du développement et l'adaptation aux variations des conditions environnementales, notamment celle de la carence en phosphate (Colin & Jaillais, 2020; Jouhet et al., 2003).

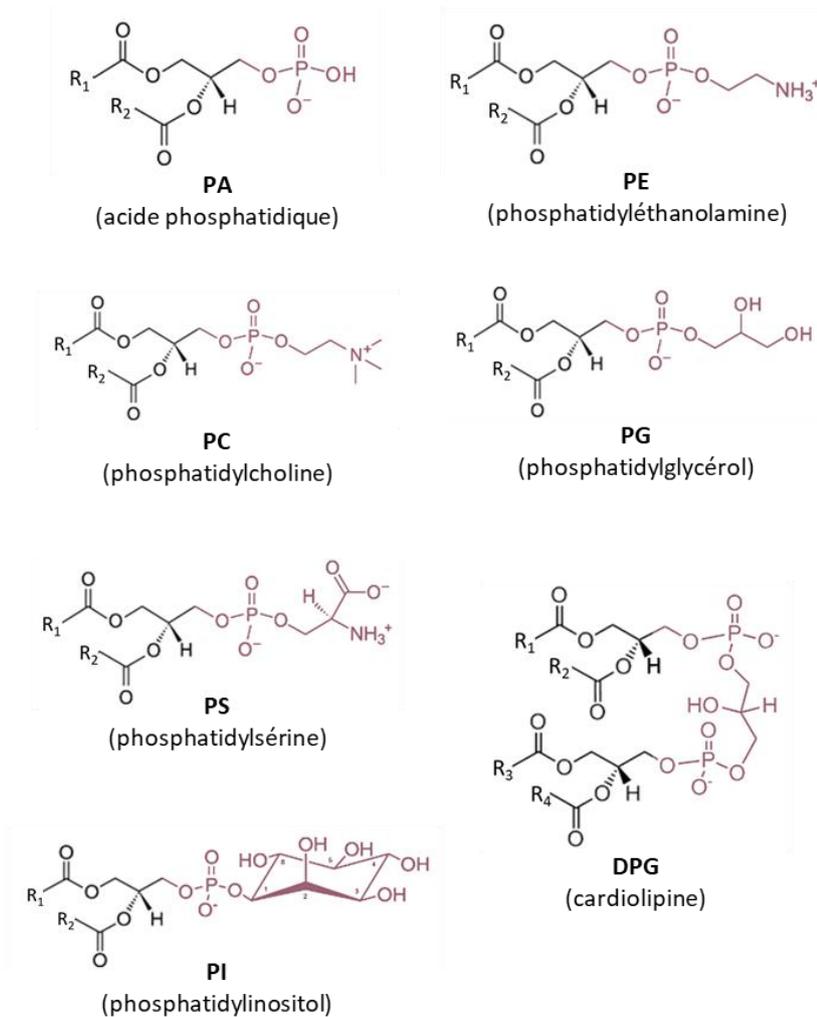


Figure 8. Structures des principaux phospholipides retrouvés chez les organismes photosynthétiques. Le squelette glycérol ainsi que les radicaux R₁ et R₂ (correspondant respectivement aux acides gras en position *sn*-1 et *sn*-2) sont représentés en noir. Les têtes polaires sont représentées en couleur.

3.3.2 Synthèse

Chez les organismes photosynthétiques, la synthèse des phospholipides a lieu principalement au niveau de la membrane du RE. Le PA y est utilisé comme précurseur pour la synthèse de l'ensemble des phospholipides extraplastidiaux (**Figure 9**). Deux voies peuvent alors rentrer en jeu. La voie « CDP-DAG » est responsable de la synthèse de PI et de PG. Elle débute par la conversion du PA en CDP-DAG par la cytidine diphosphate (CDP)-DAG synthase (CDPDS). A partir de l'intermédiaire CDP-DAG, la PI ou le PG peuvent être produits par l'action respective de la phosphatidylinositol synthase (PIS) ou de la phosphatidylglycérol synthase (PGS). La PS pourrait également être produite par la voie « CDP-DAG » (Dubots et al., 2012). La voie « Kennedy » débute quant à elle par la conversion directe du PA en DAG par l'acide phosphatidique phosphatase (PAP). Le DAG sert ensuite de précurseur à la synthèse de PC, de PE et de PS. La synthèse de PC et de PE nécessite l'apport respectif de choline et d'éthanolamine pour la constitution de leur tête polaire. Concernant la PC, les molécules de choline sont phosphorylées

par la choline/éthanolamine kinase (CEK1/2/3), aboutissant à la formation de phosphocholine (PCho). La PCho est alors activée en CDP-choline (CDP-Cho) par la CTP:phosphocholine cytidylyltransférase (CCT) avant d'être estérifiée en position *sn*-3 d'un squelette DAG pour former la PC. Cette dernière étape est réalisée par la CDP-choline:DAG choline phosphotransférase (CPT). Concernant la synthèse de PE, l'éthanolamine d'abord produite à partir de sérine est phosphorylée par la choline/éthanolamine kinase (CEK4), aboutissant à la formation de phosphoéthanolamine (PEtn). La PEtn est ensuite activée en CDP-Etn par la CTP:phosphoéthanolamine cytidylyltransférase (PECT) avant d'être estérifiée en position *sn*-3 sur le squelette DAG par la CDP-éthanolamine:DAG éthanolamine phosphotransférase (EPT), générant ainsi la PE. La PEtn peut également subir trois étapes de méthylation par les phosphatidyléthanolamine-N-méthyltransférases (PEMT1/2/3) pour être convertie en PCho. Cette voie génère ainsi une source supplémentaire de PCho pour la synthèse de PC (Nakamura, 2021) (**Figure 9**). La PS, quant à elle, est formée à partir de la PE par la PS synthase (PSS)(Vance & Steenbergen, 2005).

La cardiolipine (ou DPG) se distingue des autres phospholipides par sa structure ; elle est composée de trois motifs glycérol reliés entre eux par un groupement phosphate (**Figure 8**). Ce lipide est retrouvé exclusivement au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et sa synthèse est réalisée à partir de PA exporté depuis le RE vers la mitochondrie. Le PA y est converti en PG et ce dernier est condensé sur une molécule de CDP-DAG par la cardiolipine synthase (CLS) (**Figure 9**). Chez *A. thaliana*, le niveau de cardiolipine serait diminué en réponse à la carence en phosphate mais les raisons de ce remodelage ne sont pas connues (Katayama et al., 2004; Zhou et al., 2016).

En plus de sa production dans le RE, le PG est également synthétisé au niveau du chloroplaste. Il figure notamment parmi les composants essentiels de la membrane des thylakoïdes. Le PG est synthétisé à partir du DAG produit par la voie procaryotique ; le DAG est converti en CDP-DAG par la CDP-diacylglycerol synthase (CDS) puis en PG par la phosphatidylglycérol synthase (PGS) (**Figure 9**).

Les enzymes impliquées dans la synthèse des phospholipides ont été relativement bien décrites chez *A. thaliana* (Nakamura, 2021). L'identification de protéines homologues a permis d'inférer ces voies de synthèse à d'autres organismes photosynthétiques. La synthèse des phospholipides chez les algues semble être relativement similaire à celle des plantes, bien que les études se soient principalement concentrées sur quelques algues modèles dont la Chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* ou encore les diatomées (Li-Beisson et al., 2019; Zulu et al., 2018). De manière générale, la voie « Kennedy » est retrouvée chez les algues et permet la synthèse des glycérolipides à partir du précurseur commun DAG. Quelques différences dans la synthèse des phospholipides sont toutefois notables. Chez

Chlamydomonas reinhardtii, les gènes *PEMT* ne sont pas présents et la PC n'est pas produite (Hirashima et al., 2018) (**Figure 9**). Chez les diatomées, la synthèse des phospholipides est encore peu renseignée. Des homologues des gènes *GPAT*, *LPAAT* (acyl-CoA:lysophosphatidic acid acyl transferase) et *PAP* ont cependant été identifiés, suggérant l'existence de la voie Kennedy au niveau du RE (You et al., 2024; Zulu et al., 2018). Chez *P. tricornutum*, des homologues de *PGS* (Zulu et al., 2018) et de *PEMT* sont également présents et indiquent respectivement l'éventuelle production de PG à partir de CDP-DAG et de PC à partir de PCho (**Figure 9**).

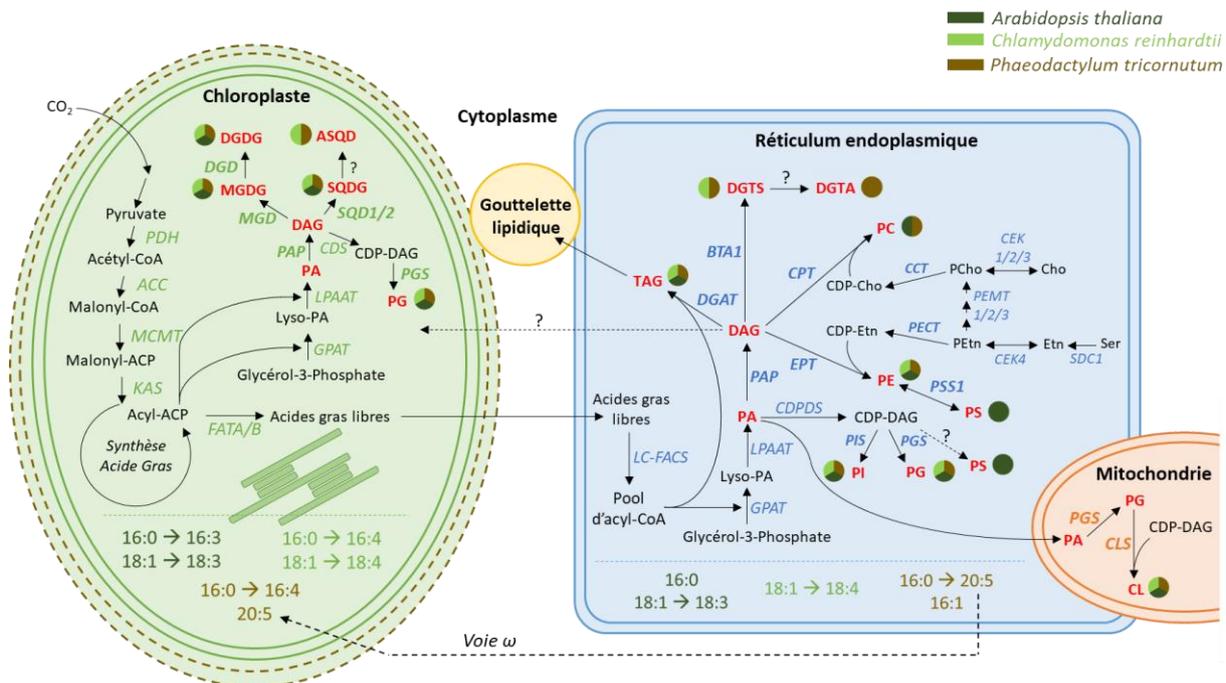


Figure 9. Synthèse des glycérolipides chez les organismes photosynthétiques. Adapté de (Bolik, 2022). Trois organismes modèles sont présentés : la plante *Arabidopsis thaliana*, la Chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* et la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*. La synthèse des acides gras prend place au niveau du plaste. Ces derniers peuvent être exportés vers le réticulum endoplasmique (RE) pour participer à la synthèse des glycérolipides extraplastidiaux (phospholipides, bêtaine lipides, TAG). La synthèse des glycérolipides (MGDG, DGDG, SQDG) se déroule dans l'enveloppe du plaste. La synthèse de l'ASQD est supposée découler du SQDG au niveau du plaste mais les mécanismes exacts ne sont pas connus. Le PG peut être produit au niveau du plaste et du RE. Les acides gras polyinsaturés estérifiés sur des squelettes glycérol (DAG ou glycérolipides) au niveau du RE peuvent être réimportés vers les plaste par la voie dite eucaryotique (ou oméga chez *P. tricornutum*). Les glycérolipides présents chez *A. thaliana* sont annotés d'un cercle vert foncé, ceux présents chez *C. reinhardtii* d'un cercle vert clair et ceux présents chez *P. tricornutum* d'un cercle marron. Le chloroplaste d'*A. thaliana* et *C. reinhardtii* est délimité par deux membranes (lignes vertes) tandis que celui de *P. tricornutum* est délimité par quatre membranes (lignes vertes et ligne pointillées marron). Les acides gras produits par ces trois organismes sont indiquée dans leur couleur respective dans la partie basse du compartiment plastique et du RE. Pour des raisons de clarté, les représentations des voies de synthèse ne sont pas localisées dans la membrane des compartiments cellulaires.

ACC, acetyl-CoA carboxylase ; **BTA1**, bêtaine lipid synthase ; **CCT**, CTP:phosphocholine cytidyltransférase ; **CDP**, cytidine diphosphate ; **CDP-Cho**, CDP-choline ; **CDP-Etn**, CDP-ethanolamine ; **CPT**, CDP-choline:DAG choline phosphotransférase ; **CEK1/2/3/4**, choline/éthanolamine kinase ; **CL**, cardiolipine ; **CLS**, cardiolipine synthase ; **DGAT** : acyl-CoA:DAG acyltransférase ; **DGD**, DGDG synthase ; **ECT**, CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférase ; **EPT**, CDP-ethanolamine:DAG ethanolamine phosphotransférase ; **FATA**, fatty acid thioesterase A/B ; **GPAT**, glycerol-3-phosphate acyl transferase ; **KAS**, ketoacyl-ACP synthase ; **LC-FACS**, long chain acyl-CoA synthetase ; **LPAAT**, 1-acyl-glycerol-3- phosphoacyltransférase ; **MCMT**, malonyl-CoA:ACP

acyltransferase ; **MGD**, MGDG synthase ; **PAP**, phosphatidic acid phosphatase ; **PCho**, phosphocholine ; **PCT**, phosphatidic acid cytidyl transferase ; **PDH**, pyruvate dehydrogenase ; **PECT**, CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransferase ; **PEMT**, phosphatidylethanolamine N-transferase ; **PEtn**, phosphoethanolamine ; **PGS**, phosphatidylglycerol synthase ; **PIS**, phosphatidylinositol synthase ; **PS**, phosphatidylserine ; **PSS1**, PS synthase ; **SDC1**, serine decarboxylase ; **SQD1/2**, SQDG synthases.

3.4 Les glycoylcérolipides

3.4.1 Description

Les glycoylcérolipides figurent parmi les lipides les plus abondants des membranes photosynthétiques. Ils sont caractérisés par la présence de dérivés de sucre au niveau de leur tête polaire et sont classés en deux principaux groupes. Le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) forment la classe des galactolipides et sont composés respectivement d'une ou deux molécule(s) de galactose. Le deuxième groupe correspond à celui des sulfolipides et est constitué du sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et de l'acyl-SQDG (ASQD) (**Figure 10**). Chez les plantes, le MGDG, le DGDG et le SQDG sont largement majoritaires et représentent en moyenne 80% des lipides des membranes chloroplastiques (Block et al., 1983; Reszczyńska & Hanaka, 2020). Ces trois lipides se retrouvent en proportions importantes dans les membranes thylakoïdiennes ainsi que dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste ; membranes dans lesquelles le PG est également retrouvé. La membrane externe du chloroplaste est quant à elle constituée d'une plus grande diversité de phospholipides (PC, PI et PG) en plus du MGDG et du DGDG (Block et al., 1983; Douce & Joyard, 1990). Chez les algues dérivées d'endosymbiose secondaire, la proportion et la localisation des glycoylcérolipides au sein du plaste sont moins connues. Les différentes membranes entourant le plaste secondaire ne peuvent pas être isolées, rendant ainsi difficile la compréhension du métabolisme lipidique chez ces organismes. Seules des analyses globales ont pu renseigner ces mécanismes. Chez *P. tricornutum*, le MGDG est majoritaire sur l'ensemble de la cellule et représente environ 35% des glycérolipides totaux. Le SQDG est le deuxième glycoylcérolipide produit en terme de proportion (environ 20% des glycérolipides totaux) suivi du DGDG qui, comme le PG, représente moins de 10% des glycérolipides totaux (You et al., 2024). Une étude récente a identifié des enzymes de synthèse du PG, du MGDG, du DGDG et du SQDG au sein de plastes isolés de *P. tricornutum*, confirmant la présence de ces derniers dans les membranes plastidiales (Huang et al., 2023). L'ASQD, quant à lui, est beaucoup moins représenté que le reste des glycoylcérolipides. Il a été identifié en petite quantité chez quelques algues dont *C. reinhardtii* (Riekhof et al., 2003) et *P. tricornutum* (Naumann et al., 2011).

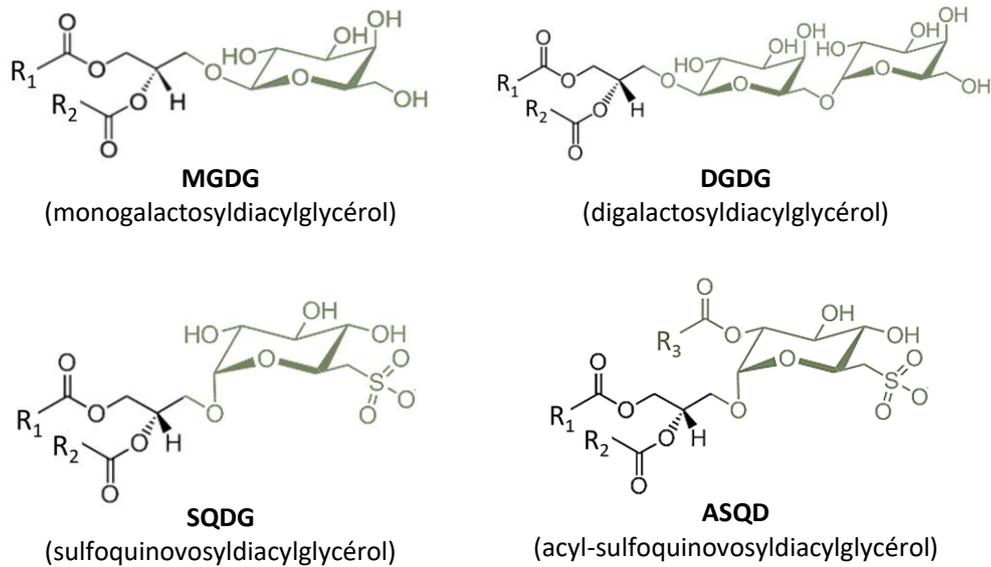


Figure 10. Structures des glycosylglycérolipides retrouvés chez les organismes photosynthétiques. Le squelette glycérol ainsi que les radicaux R_1 et R_2 (correspondant respectivement aux acides gras en position *sn*-1 et *sn*-2) sont représentés en noir. Les têtes polaires sont représentées en couleur.

3.4.2 Synthèse

Chez les plantes, la synthèse des glycosylglycérolipides se déroule dans l'enveloppe du chloroplaste. Comme expliqué précédemment, deux voies peuvent aboutir à la formation de ces lipides. Les glycosylglycérolipides issus de la voie procaryotique sont produits à partir du DAG synthétisé dans le chloroplaste à partir de PA tandis que ceux de la voie eucaryotique sont produits à partir de DAG exporté depuis le RE. Les signatures C16 ou C18 en position *sn*-2 indiquent ainsi la provenance des lipides produits chez les angiospermes (**Figure 7**). Quel que soit son origine, le DAG sert de précurseur commun à la synthèse de MGDG, DGDG et SQDG. Les enzymes MGD (MGDG synthase) et DGD (DGDG synthase) peuvent successivement ajouter une molécule de galactose en position *sn*-3 du DAG, générant respectivement le MGDG et le DGDG (Jarvis et al., 2000; Kelly et al., 2003). Le SQDG est quant à lui synthétisé par l'enzyme SQD2 (SQDG synthase) avec l'addition d'un groupement sulfoquinovose en position *sn*-3 du DAG (Yu et al., 2002) (**Figure 9**).

Chez les algues, la synthèse des glycosylglycérolipides est relativement similaire à celle des plantes (**Figure 9**). Les homologues des enzymes de synthèse du MGDG, du DGDG et du SQDG ont été identifiées dans de nombreuses espèces, notamment *P. tricornutum* (Guéguen, 2022; Zulu et al., 2018). Des différences sont toutefois notables selon les espèces. Chez quelques Chlorophytes dont *C. reinhardtii*, les glycosylglycérolipides ne portent pas la signature eucaryotique C18 en position *sn*-2 et seraient donc uniquement issus de la voie chloroplastique. L'identification d'une LPAAT du RE générant l'addition d'un C16 en position *sn*-2 a toutefois remis en cause ces observations (Li-Beisson et al., 2019). Les microalgues marines sont caractérisées par la production importante de VLC-PUFAs. Chez les

diatomées, la voie ω contribuerait notamment au transport de l'EPA depuis le RE jusqu'au plaste, expliquant la grande proportion de 20:5 au niveau des galactolipides (You et al., 2024) (**Figure 7**).

3.5 Les bétaines lipides

Les bétaines lipides (BL) forment une troisième classe de glycérolipides membranaires chez les organismes photosynthétiques. Ces lipides se retrouvent dans un grand nombre d'algues mais sont également détectés chez les bactéries, les champignons et certaines plantes issues de clades ancestraux. La description et la synthèse des BL sont détaillées dans la section III de l'introduction.

II. Adaptation des organismes photosynthétiques à la carence en phosphate

1. L'importance du phosphate

1.1 Ressources et enjeux sociétaux

Bien qu'il soit déterminant pour l'agriculture, le phosphore (P) constitue une ressource limitée et non renouvelable. Après l'azote (N), c'est le macronutriment qui affecte le plus la croissance des plantes. Le P est relativement peu abondant au sein de la croûte terrestre et sa libération naturelle ne se fait que par un lent processus d'altération des roches. La biomasse des producteurs primaires (algues, plantes et cyanobactéries) se retrouve ainsi fréquemment limitée par la disponibilité en P, affectant aussi bien les écosystèmes terrestres que marins (Elser, 2012; Elser et al., 2007). Dans les sols cultivés, la concentration moyenne en P_i est comprise entre 0,8 et 2 μM (Nussaume & Kanno, 2024). Ces concentrations sont généralement insuffisantes pour la croissance des plantes car ces dernières nécessitent une concentration minimale de 10 μM (Raghothama, 2000). A l'inverse, les concentrations standards utilisées dans nos recherches sont de l'ordre de 1 mM et représentent ainsi un large excès par rapport aux conditions naturelles.

La très faible disponibilité du P dans le sol a conduit l'industrie agricole à utiliser massivement des engrais enrichis en P et en N depuis la révolution verte. Actuellement, l'agriculture dépend presque exclusivement du P extrait de roches phosphatées provenant de quelques pays tels que le Maroc, la Chine, les Etats-Unis, l'Afrique du Sud et la Jordanie (Cordell et al., 2009). En l'an 2000, 80% du P extrait de ces roches était utilisé pour la fabrication d'engrais, avec une efficacité d'absorption par les plantes comprise entre seulement 15 et 30% (Syers et al., 2008). Le P inutilisé est rejeté dans les eaux usées ou déversé directement dans l'environnement, polluant les surfaces agricoles, les rivières et les océans (Solovchenko et al., 2016). Cette pollution a pour effet de réduire la qualité des eaux mais également de perturber lourdement les écosystèmes par le biais de l'eutrophisation. L'excès de P dans les sols génère une réduction de la biodiversité, une altération de la faune et de la flore terrestre ainsi qu'une perturbation des cycles biogéochimiques. L'eutrophisation des milieux aquatiques a également de lourdes conséquences, avec notamment l'apparition de blooms de phytoplanctons hautement toxiques pour la santé humaine (V. H. Smith et al., 1999).

La gestion du P représente un défi majeur pour la préservation de l'environnement et la sécurité alimentaire. Les ressources exploitables en P seront majoritairement épuisées d'ici la fin du siècle (Cordell & White, 2014) alors que l'accroissement de la population mondiale nécessite une

augmentation constante de la production alimentaire. L'utilisation d'engrais enrichis en P a permis de nourrir des milliards de personnes depuis la révolution verte et il est désormais impératif de préserver cet élément essentiel pour l'environnement et l'alimentation humaine. Les stratégies durables de gestion du P s'articulent autour de grands principes basés sur :

- une augmentation de l'efficacité d'utilisation du P dans l'agriculture,
- une réduction de la dépendance aux sources non renouvelables de P,
- une optimisation de la fertilité des sols,
- le respect de l'environnement par la réduction des impacts de l'eutrophisation sur les écosystèmes terrestres et aquatiques,
- et enfin, une réduction des pertes et du gaspillage du P tout au long de son processus d'extraction et d'utilisation (Cordell & White, 2014).

Ce dernier point fait l'objet de recherches innovantes, notamment dans le domaine de la récupération et du recyclage du P provenant des eaux usées (Ashley et al., 2009; Cornel & Schaum, 2009). Ces nouvelles biotechnologies impliquent l'utilisation d'organismes accumulateurs de P afin de récupérer et de recycler le P des eaux usées pour la fabrication d'engrais ou de biocarburants (De-Bashan & Bashan, 2004). Les microalgues sont notamment capables d'accumuler de grandes quantités de P (allant jusqu'à 3 % de leur poids sec) et suscitent donc un intérêt croissant dans ces applications (Powell et al., 2009).

1.2 Généralités sur le métabolisme du phosphate chez les organismes photosynthétiques

Le P est un nutriment essentiel à la croissance et au développement des organismes. Il est nécessaire à la synthèse de molécules indispensables telles que les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Chez les organismes photosynthétiques, le P occupe un rôle primordial dans le métabolisme énergétique. Il participe notamment à des processus biologiques vitaux tels que la photosynthèse, la respiration, la glycolyse et la transduction du signal (Clarkson, 1996; Raghothama & Karthikeyan, 2005). Comme évoqué précédemment, le P entre également dans la composition des phospholipides et joue un rôle essentiel dans la formation et l'architecture des membranes extraplastidiales. Il est notamment mobilisé lors du remodelage lipidique déclenché par la carence en P et ce dernier point est abordé en détail dans les sections 2 et 3.

1.2.1 Transport et stockage du phosphate chez les plantes supérieures

Le P est l'un des nutriments les moins biodisponibles du sol. Il s'y trouve majoritairement complexé à d'autres métaux et seule sa forme inorganique, le phosphate (Pi), peut être directement assimilée par

les plantes (Raghothama, 2000). Une fois absorbé, le Pi peut être transporté, distribué et remobilisé à travers l'ensemble de la plante grâce à des transporteurs spécifiques. Souvent limitant, le Pi fait l'objet d'une régulation très fine et un grand nombre de mécanismes sont mis en place afin d'optimiser son utilisation. Les transporteurs de Pi ont un rôle essentiel dans ces mécanismes et sont eux-mêmes finement régulés pour contrôler les niveaux de Pi à l'intérieur des cellules mais également à l'échelle de la plante entière (Chen et al., 2011; Raghothama & Karthikeyan, 2005; F. Wang et al., 2018).

Au niveau des racines, le Pi est transporté par voie apoplastique à travers le parenchyme cortical et pénètre ensuite à l'intérieur des cellules de l'endoderme grâce à des transporteurs spécifiques de la famille PHT1 (specific phosphate transporters 1) (Bucher et al., 2001; Rausch & Bucher, 2002; F. W. Smith, 2002). L'apport du Pi au niveau de l'endoderme peut également être facilité par l'action de champignons mycorhiziens arbusculaires en association symbiotique avec la plante (**Figure 11A**) (S. E. Smith et al., 2003). Le Pi transite ensuite par la voie symplastique (intracellulaire) pour être utilisé ou stocké localement. Il est également transporté vers les parties aériennes de la plante à travers les vaisseaux du xylème. Au niveau intracellulaire, la répartition du Pi est spécifique à chaque compartiment (**Figure 11A**). La vacuole constitue le stock le plus important car elle contient entre 85 et 95% du Pi libre cellulaire (Rausch & Bucher, 2002). Sa concentration en Pi varie de 1 à 3 mM et c'est notamment la première réserve à être utilisée lors d'une carence en Pi (Jouhet, 2005; Y. Wang et al., 2021). Les mécanismes de transport du Pi à travers la membrane du tonoplaste sont encore peu compris, bien que les transporteurs de la famille PHT5 semblent être impliqués dans l'influx de cet élément dans la vacuole (Liu et al., 2016). Le cytosol représente quant à lui le compartiment le plus faible en Pi libre avec une concentration comprise entre 10 et 100 μ M (Jouhet, 2005). Le niveau de Pi cytosolique est régulé très finement et varie en fonction des concentrations retrouvées aux niveaux de la vacuole et du milieu extracellulaire (Raghothama, 1999). Cette régulation est nécessaire à l'approvisionnement des différents organites tels que le chloroplaste ou la mitochondrie. Ces derniers ont une demande en Pi importante, notamment en raison de leur fonction énergétique. Concernant la mitochondrie, l'influx de Pi est réalisé par les transporteurs de la famille PHT3 (W. Zhu et al., 2012) et contribue ainsi à la production d'ATP au niveau de la matrice mitochondriale (Hamel et al., 2004). Les transporteurs de la famille PHT2 permettent quant à eux l'influx de Pi à travers l'enveloppe des plastes (Ferro et al., 2002), conjointement à la présence d'antiports sucre/Pi (triose-phosphate/phosphate translocator, TPT) sur ces mêmes membranes (Flügge et al., 1989). Enfin, les transporteurs PHT4 seraient impliqués dans l'export du Pi hors de l'appareil de Golgi. Cet export permettrait d'éviter une accumulation trop importante de Pi générée par la glycosylation des lipides et des protéines (Cubero et al., 2009; Guo et al., 2008) (**Figure 11A**).

Les quantités et les formes de stockage du P varient en fonction des tissus de la plante. Les racines présentent les concentrations de P les plus faibles et ces dernières augmentent progressivement dans la tige, les feuilles et les graines (Noack et al., 2014). A l'échelle de la plante entière, le P est principalement stocké sous sa forme libre (dans la vacuole et le cytosol) et sous sa forme organique en tant que constituant des phospholipides et des acides nucléiques (Wieczorek et al., 2022). Une étude réalisée sur le blé et le colza a montré que ces différentes formes de stockage différaient selon le tissu concerné. Dans les racines, le Pi libre et les phospholipides constituent les deux formes principales de stockage du P et sont présents en quantités équivalentes. Dans les parties aériennes, le Pi libre est largement majoritaire et représente 85 % du P total tandis que les phospholipides y contribuent à hauteur de 15 % (**Figure 11A**). Les graines, quant à elles, contiennent les plus fortes concentrations en P et le stockent majoritairement sous la forme d'inositol polyphosphates (InsP) au niveau de la vacuole (Noack et al., 2014; Yang et al., 2017).

1.2.2 Transport et stockage du phosphate chez les microalgues

Chez les microalgues marines, le P est également assimilé sous sa forme inorganique biodisponible. Le Pi se trouve solubilisé dans l'eau ou directement lié à la paroi de l'algue et est acquis par transport actif à l'intérieur de la cellule. Des composés phosphatés organiques (AMP cyclique, phospholipides, pyrophosphate) peuvent également être assimilés grâce à l'action d'enzymes extracellulaires capables d'hydrolyser ces molécules avant leur absorption sous forme inorganique (Cembella et al., 1982; Solovchenko et al., 2016) (**Figure 11B**). Les dynamiques d'absorption du Pi sont influencées par divers facteurs environnementaux tels que la lumière, le pH, la salinité, la température et la disponibilité en nutriments (Cembella et al., 1982; Powell et al., 2009). Le milieu aquatique est très inégal en termes de quantités de P ; certaines régions océaniques sont très riches (concentrations supérieures à 100 nM) et permettent une croissance optimale des organismes. A l'inverse, certaines régions sont plus limitées et peuvent atteindre des concentrations en Pi inférieures à 10 nM. Les microalgues évoluant dans ces régions appauvries se sont donc adaptées à ces conditions et peuvent réduire leur besoin en Pi jusqu'à 50 % (Van Mooy et al., 2009). Les microalgues utilisés dans nos laboratoires sont quant à elles cultivées à une concentration d'environ 0,22 mM, ce qui représente un large excès par rapport aux conditions naturelles.

Chez les microalgues, le stockage du Pi intracellulaire se réalise généralement sous la forme de polyphosphates (polyP) (**Figure 11B**). Ces composés sont des polymères linéaires constitués de centaines de résidus de Pi. Généralement situés au niveau de la vacuole ou de vésicules, ils constituent une réserve conséquente de Pi et peuvent se complexer à d'autres éléments tels que le magnésium,

Figure 11. Représentation simplifiée du transport et du stockage du phosphate chez les plantes supérieures (A) et les microalgues marines (B). (A) Le phosphate (Pi) pénètre à l'intérieur des cellules de l'endoderme grâce aux transporteurs PHT1. Cette assimilation peut être favorisée par l'action de champignons mycorrhiziens. Le Pi est utilisé dans les racines et également transporté vers les parties aériennes de la plante par les vaisseaux du xylème. Il pénètre alors à l'intérieur des cellules et des différents organites intracellulaires par des transporteurs spécifiques de la famille PHT. L'influx de Pi par ces transporteurs se réalise par symport avec des protons et des pompes à protons ATPase dépendantes sont donc également présentes sur ces membranes. Ces pompes ne sont pas représentées par mesure de clarté. (B) Chez les microalgues marines, le Pi peut se trouver sous forme solubilisée dans l'eau ou être directement lié à la paroi cellulaire. Des composés phosphatés organiques peuvent également être assimilés par la cellule grâce à des enzymes hydrolytiques. A l'intérieur de la cellule, le Pi est utilisé ou stocké sous forme de polyphosphates. **PHT**, specific phosphate transporters ; **TPT**, triose-phosphate/phosphate translocator; **nd**, non détecté. Références : Jouhet, 2005 (1), Noack *et al.*, 2014 (2), Van Mooy *et al.*, 2009 (3), Nussaume & Kanno, 2024 (4), Solovchenko *et al.*, 2016.

1.3 Impacts de la carence en phosphate sur les organismes photosynthétiques

1.3.1 Impacts chez les plantes supérieures

Suite à la carence en Pi, diverses réponses regroupées sous le nom de « Pi starvation responses » (PSR) se mettent en place afin de remobiliser le Pi. Ces réponses sont elles-mêmes régulées par l'action de facteurs de transcription clés tels que ceux de la superfamille PHOSPHATE RESPONSE (PHR) et PHR1-like (PHL) (Sun *et al.*, 2016). Ces régulateurs transcriptionnels permettent d'activer un vaste ensemble d'autres facteurs de transcription impliqués dans divers processus physiologiques. L'ensemble de ces réponses sont également coordonnées par diverses molécules signal telles que le calcium et les InsP. Ces composés participent à la détection des niveaux intracellulaire de Pi et sont ainsi à l'origine du déclenchement des réponses transcriptionnelles. Des micro ARN mobiles peuvent également participer à ces mécanismes en véhiculant les informations à travers l'ensemble du réseau systémique de la plante (Chiou & Lin, 2011; Puga *et al.*, 2017). Les réponses enclenchées génèrent alors des modifications importantes du métabolisme, de la physiologie et de la morphologie.

Les réponses morphologiques de la plante soumise à une carence en Pi seraient les premières à se mettre en place dans le temps (Hammond *et al.*, 2004). Une modification importante de l'architecture racinaire est observée. La production de gibbérellines favorise notamment la prolifération des racines latérales et renforce ainsi leur capacité à explorer le sol pour la recherche de Pi (Jiang *et al.*, 2007; Lynch & Brown, 2001). La croissance générale, quant à elle, est fortement diminuée en raison d'un ralentissement de la division cellulaire (Sano *et al.*, 1999). Le développement des parties aériennes est inhibé au profit de la croissance racinaire, impactant ainsi lourdement la biomasse de la plante.

Les mécanismes d'acquisition et de transport du Pi sont fortement modulés lors de la carence phosphatée. L'expression accrue de transporteurs de Pi permet de favoriser l'absorption de ce nutriment par les racines et d'orienter son transport à travers la plante. Les transporteurs de la famille

PHT1 seraient notamment induits dans ces mécanismes pour augmenter l'acquisition du phosphate par les racines (Remy et al., 2012). L'augmentation des transporteurs au niveau de la membrane de la vacuole facilite également la remobilisation du Pi qui y est stockée en grande quantité (Mimura et al., 1996; Puga et al., 2017).

Le métabolisme énergétique est aussi modulé en situation de carence de Pi. Dans les processus de la glycolyse ou du cycle de Krebs, des voies alternatives peuvent se mettre en place afin de diminuer l'utilisation de molécules phosphatées telles que l'ATP, l'ADP ou le Pi lui-même (Hammond et al., 2004; Misson, 2004). Les processus de photorespiration et de synthèse des protéines sont quant à eux ralentis (Puga et al., 2017). La photosynthèse est initialement maintenue lors de la carence en Pi et s'accompagne d'une synthèse accrue d'amidon dans le chloroplaste. En effet, l'induction de l'enzyme de synthèse de l'amidon (ADP-glucose pyrophosphorylase) ainsi que la levée de son inhibition par le Pi lui-même engendrent une accumulation importante d'amidon en situation de carence (Ciereszko et al., 2001). La réduction du niveau cytoplasmique de Pi provoque également une diminution de l'efflux par les transporteurs TPT de triose-phosphates générés par la photosynthèse. Ces triose-phosphates sont ainsi convertis en amidon en attendant leur éventuelle utilisation pour le maintien de la photosynthèse (Poirier & Bucher, 2002).

1.3.2 Impacts chez les microalgues

Les microalgues évoluent dans un environnement très variable en termes de disponibilité en nutriments ; elles ont donc adapté de manière spécifique leurs stratégies d'assimilation et de stockage. Les microalgues peuvent assimiler une quantité de Pi largement supérieure à leurs besoins lorsque ce dernier se raréfie. Cette absorption excessive peut également se produire lorsque le Pi est présent en quantité suffisante dans l'environnement, générant ainsi un pool supplémentaire à celui qui est utilisé pour la croissance (Singh et al., 2018). Comme évoqué précédemment, le Pi absorbé en excès est stocké sous la forme de polyP et peut ainsi être utilisé pour le maintien des fonctions métaboliques en cas de carence (**Figure 11B**).

La croissance des cellules est largement ralentie en situation de carence en Pi. Chez *P. tricornutum*, la division cellulaire commence à stagner dès les premières 48 heures de privation et le métabolisme du carbone s'en trouve fortement impacté. Les capacités photosynthétiques sont notamment diminuées et l'expression des gènes impliqués dans le cycle de Calvin est également réduite (Cruz de Carvalho et al., 2016). Chez les microalgues carencées, le flux de carbone est dirigé en priorité vers la synthèse de composés de stockage tels que les TAG (sous forme d'huile) et les polysaccharides. La nature de ces

derniers varie selon les espèces ; l'amidon est généralement retrouvé chez les algues vertes (Vonlanthen et al., 2015) tandis que la chrysolaminarine peut être observée chez les endosymbiontes secondaires tels que *P. tricornutum* (Brembu et al., 2017). Les proportions de TAG et de polysaccharides fluctuent selon les conditions et l'espèce. Chez les diatomées telles que *P. tricornutum* et *Thalassiosira pseudonana*, la synthèse de chrysolaminarine est nettement diminuée au profit de l'accumulation de TAG lors de la carence en Pi (Cruz de Carvalho et al., 2016; Dyhrman et al., 2012).

2. Remodelage lipidique des plantes terrestres en réponse à la carence en phosphate

Le remodelage lipidique est un mécanisme adaptatif largement conservé chez les plantes et s'avère indispensable à leur tolérance face à la carence en Pi. Dans la cellule végétale, un tiers des réserves de Pi est stocké au niveau des phospholipides (Poirier et al., 1991). En situation de carence, ces phospholipides sont dégradés par hydrolyse afin de fournir à la cellule de nouvelles sources de Pi. Le phosphate libéré assure ainsi le maintien de fonctions cellulaires vitales telles que la réplication de l'ADN, la production d'ATP ou la synthèse de protéines. D'autre part, l'hydrolyse des phospholipides génère la libération de squelettes DAG qui sont utilisés pour la synthèse et l'accumulation de glycérolipides non phosphatés tels que le DGDG et le SQDG. Ces derniers peuvent alors remplacer les phospholipides dégradés pour assurer le maintien de l'intégrité des membranes. Le remodelage lipidique en situation de carence en Pi implique ainsi deux principales voies : la dégradation des phospholipides et l'accumulation de glycérolipides (Nakamura, 2013) (**Figures 12 et 13**).

2.1. Hydrolyse des phospholipides

Chez les plantes, la limitation en Pi génère une diminution globale du contenu en phospholipides. Cette diminution concerne en grande partie la PC, la PE ainsi que le PG (**Figure 12**) (Essigmann et al., 1998; Jouhet et al., 2004). Cependant, une augmentation transitoire de la PC est observée lors de la phase précoce de la carence en Pi. Cette augmentation résulte d'une activation de la production de PC ou d'un ralentissement de sa dégradation et semble également s'accompagner d'une conversion des autres phospholipides en PC. Le pool de DAG ensuite généré par une hydrolyse massive de la PC serait redirigé vers la synthèse des galactolipides au niveau du chloroplaste (Jouhet et al., 2003).

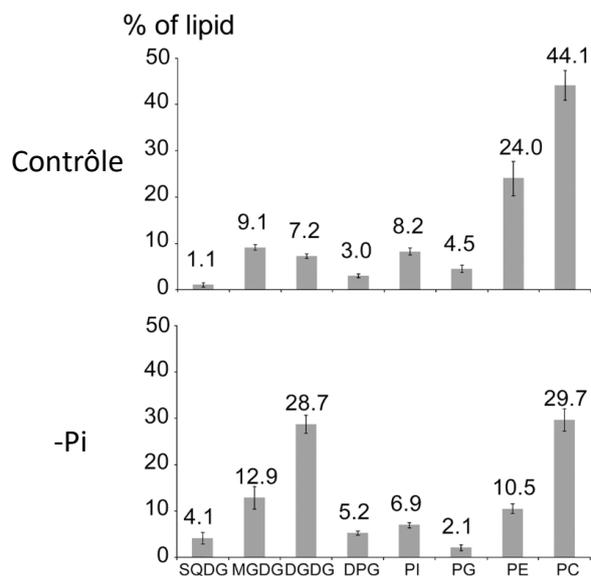


Figure 12. Composition en glycérolipides de cellules d'*A. thaliana* en condition contrôle ou en condition de carence en phosphate (-Pi). D'après (Jouhet *et al.*, 2004).

L'hydrolyse des phospholipides peut être réalisée par différentes voies selon l'organisme, les conditions ou le tissu concerné. Chez *A. thaliana*, la voie de la phospholipase C non spécifique (NPC) est prédominante (Nakamura, 2013). Les enzymes NPC sont responsables de la conversion de la PC ou de la PE en DAG et les isoformes 4 et 5 semblent être spécifiquement impliquées dans la réponse à la carence en Pi. NPC4 serait notamment responsable de la dégradation et du remplacement des phospholipides de la membrane plasmique des cellules racinaires tandis que NPC5 jouerait un rôle dans l'accumulation du DGDG au niveau des feuilles (Gaude *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2005). Les phospholipases C sont également impliquées dans l'hydrolyse spécifique du PI (PI-PLC) suite à la carence en Pi, bien que cette voie reste minoritaire par rapport à la voie NPC (Misson *et al.*, 2005; Nakamura, 2013) (**Figure 13**).

Une deuxième voie peut être impliquée dans la conversion de la PC en DAG, se réalisant cette fois en deux étapes distinctes : la conversion de la PC en PA par une phospholipase D (PLD) suivie de la conversion du PA en DAG par une phosphatidic acid phosphatase (PAP) (**Figure 13**). Plusieurs études semblent indiquer que cette voie est spécifique à la racine. En effet, il a été montré que les phospholipases D ζ 1 et D ζ 2 étaient impliquées dans la dégradation de la PC et l'accumulation du DGDG extraplastidial au niveau des cellules racinaires en réponse à la carence en Pi (Cruz-Ramírez *et al.*, 2006; Gaude *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006). Les enzymes PAP jouent ensuite un rôle essentiel dans l'hydrolyse du PA et la libération de groupements phosphates en situation de carence. Chez *A. thaliana*, les PAP de type 2 (PAP2) semblent être impliquées dans la réponse au déficit en Pi, notamment les phosphatidates phosphohydrolase 1 et 2 (PAH1 et 2). Ces dernières auraient un rôle central dans la conversion du PA en DAG et dans l'accumulation de DGDG dans les membranes extraplastidiales (Nakamura *et al.*, 2009).

Enfin, l'hydrolyse des phospholipides peut également s'effectuer par une troisième voie encore peu étudiée et impliquant l'action d'hydrolases d'acides gras (LAH, lipid acyl hydrolase) et de glycérophosphodiester phosphodiesterases (GDPD). La PC (ou la PE) est d'abord hydrolysée par une LAH, générant ainsi la libération d'acides gras et la production du glycérophosphodiester (GPD). Le GPD est ensuite converti en glycérol-3-phosphate (G3P) par une GDPD (**Figure 13**). Cette voie alternative a la particularité de ne pas libérer de groupements phosphate et serait principalement impliquée dans la dégradation des phospholipides plutôt que dans leur conversion en galactolipides (Cheng et al., 2011). Chez *A. thaliana*, l'implication des LAH dans la réponse à la carence en Pi n'est pas encore bien comprise (Matos & Pham-Thi, 2009; Nakamura, 2013).

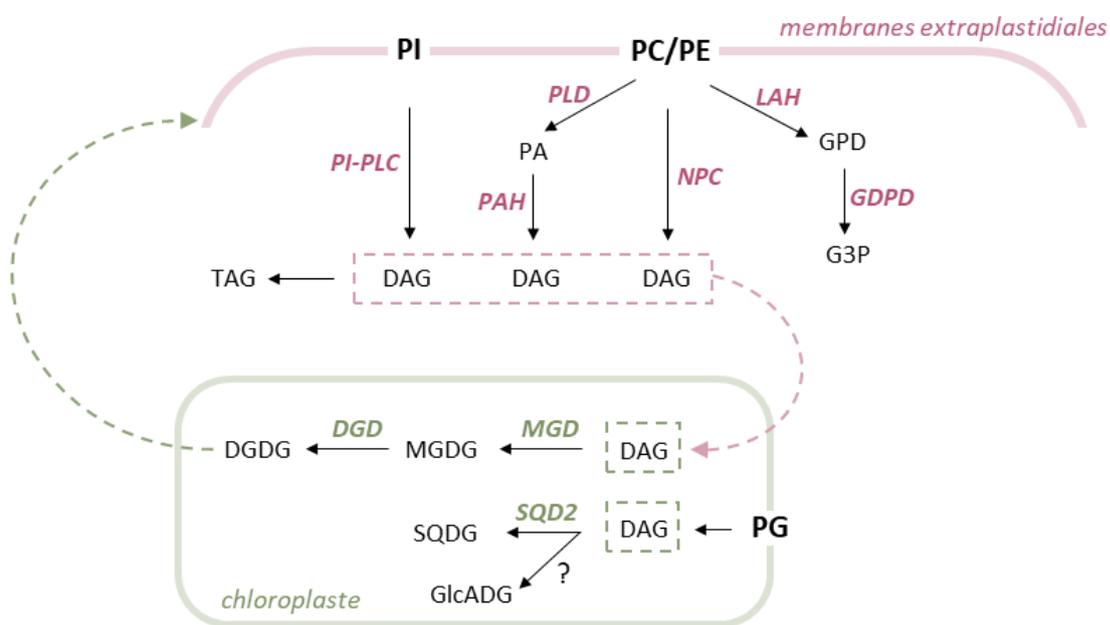


Figure 13. Remodelage lipidique en réponse à la carence en Pi chez *A. thaliana*, inspiré de (Zhu et al., 2022). Au niveau des membranes extraplastidiales, les enzymes de dégradation des phospholipides (notées en rose) génèrent la production de DAG ou de G3P. Les molécules de DAG peuvent servir à la synthèse des TAG ou être exportés vers le chloroplaste avant d'être utilisés pour la synthèse et l'accumulation des glycolipides plastidiaux (MGDG, DGDG et SQA2). Le DGDG est exporté vers les membranes extraplastidiales (membranes du tonoplaste ou de la mitochondrie) pour remplacer les phospholipides dégradés. Le SQA2 est utilisé pour remplacer le PG au sein des membranes thylakoïdiennes.

DGD, DGDG synthase ; **LAH**, lipid acyl hydrolase ; **MGD**, MGDG synthase ; **NPC**, non-specific phospholipase C ; **GDPD**, glycérophosphodiester phosphodiesterases ; **GlcADG**, glucuronosyldiacylglycérol ; **GPD**, glycérophosphodiester ; **G3P**, glycérol-3-phosphate ; **PAH**, phosphatidate phosphohydrolase ; **PI-PLC**, PI-specific phospholipase C ; **PLD**, phospholipase D.

2.2. Accumulation des galactolipides et des sulfolipides

Le remodelage lipidique induit par la carence en Pi est marqué par une nette augmentation des lipides plastidiaux, notamment du DGDG et du SQA2 (**Figure 12**). Le niveau du MGDG reste quant à lui faiblement modifié en situation de carence (Essigmann et al., 1998; Jouhet et al., 2003), bien que les

enzymes de synthèse des galactolipides (MGD et DGD) soient fortement activées dans cette condition (Awai et al., 2001; Kelly & Dörmann, 2002). Ces observations suggèrent que la synthèse accrue de DGDG provient d'une dynamique de conversion très rapide entre le DAG, le MGDG et le DGDG (Jouhet et al., 2003). En effet, plusieurs études menées chez *A. thaliana* ont montré que l'expression des isoformes MGD2 et MGD3 était fortement induite et générerait l'accumulation du DGDG au niveau de la racine lors de la carence en Pi. Ces isoformes auraient une préférence de substrat pour le DAG issu de la voie eucaryotique, suggérant que la synthèse de MGDG en situation de carence est spécifiquement induite pour générer l'accumulation du DGDG (Awai et al., 2001; Jouhet et al., 2003; Kobayashi et al., 2004). Des études ont également montré que l'expression de l'isoforme MGD1 était induite au niveau des feuilles lors de la carence de Pi et contribuait de la même manière à l'augmentation du DGDG (Kobayashi et al., 2009; Nakamura et al., 2009).

Bien qu'il soit synthétisé dans l'enveloppe du chloroplaste, le DGDG accumulé suite à la carence est utilisé pour remplacer les phospholipides dégradés au niveau des membranes extraplastidiales. Les isoformes DGD1 et DGD2 semblent être toutes les deux activées lors de la carence de Pi (Kelly et al., 2003; Kelly & Dörmann, 2002). DGD2 agirait notamment en coopération avec les MGD2 et 3 au niveau de la membrane externe chloroplastique pour stimuler la production de DGDG (Kelly et al., 2003). Chez les plantes, l'accumulation extraplastidiale de DGDG s'opère au niveau des membranes du tonoplaste, de la membrane plasmique et de la mitochondrie (Andersson et al., 2005). Le transport du DGDG du chloroplaste vers la mitochondrie serait notamment favorisé par l'augmentation du nombre de sites de contacts entre les deux organites lors de la phase précoce de la carence en Pi (Jouhet et al., 2004). Il est important de noter que l'export du DGDG permet de remplacer seulement une portion de la PC présente dans les membranes extraplastidiales. En effet, les caractéristiques biophysiques du DGDG favoriseraient la rigidité et l'empilement des membranes, ce qui est essentiel pour la structure des membranes chloroplastiques mais incompatible avec celle des membranes extraplastidiales (Kanduc et al., 2017). Le remplacement de la PC par le DGDG en carence de Pi serait donc limité afin de maintenir les propriétés biophysiques naturelles des membranes extraplastidiales.

Le niveau de SQDG est également augmenté lors de la carence en Pi chez *A. thaliana* (**Figures 12**). Ce lipide serait spécifiquement impliqué dans le remplacement du PG dans la membrane des thylakoïdes (Yu et al., 2002). Une étude récente a notamment démontré que ces deux lipides partageaient les mêmes propriétés biophysiques au sein des membranes, suggérant qu'ils étaient de bons substituts l'un pour l'autre (Bolik et al., 2022). Cependant, le rôle essentiel du PG dans la fonction des membranes thylakoïdiennes semble limiter son remodelage par le SQDG, bien que ces mécanismes restent encore peu connus (Babiychuk et al., 2003; Hagio et al., 2002; Nakamura, 2013). De plus, ce remodelage

semble être exclusivement limité aux thylakoïdes car le SQDG n'a jamais été décrit dans d'autres membranes.

2.3. Autres aspects du remodelage lipidique

Chez les plantes, la carence en Pi induit également une nette augmentation des TAG. La synthèse de ces derniers peut être augmentée de plus de treize fois dans cette condition, que ce soit au niveau de la racine ou des parties aériennes (Pant et al., 2015). La synthèse des TAG serait réalisée par une diacylglycérol acyl transférase (DGAT1) responsable du transfert d'acyl-CoA sur un squelette DAG (Kaup et al., 2002). Chez *A. thaliana*, l'expression de *DGAT1* ne semble pas être induite par la carence en Pi (Pant et al., 2015) mais d'autres mécanismes sont probablement mis en jeu pour réguler l'activité de l'enzyme en situation de carence, tels que des modifications post-traductionnelles ou des interactions protéiques (S. Zhu et al., 2022).

Le glucuronosyldiacylglycérol (GlcADG), un glycolipide identifié en 2013 chez *A. thaliana*, est également produit de manière spécifique dans le chloroplaste en réponse à la carence en Pi. Il partagerait la même voie de biosynthèse que le SQDG et serait essentiel à la protection de la plante face à la carence (Okazaki et al., 2013).

3. Remodelage lipidique des microalgues en réponse à la carence en phosphate

Les microalgues sont dotées de mécanismes d'adaptation particulièrement efficaces pour faire face à la carence en Pi. Le remodelage lipidique mis en place dans cette condition suit le même principe que celui qui est observé chez les plantes, à savoir un remplacement des phospholipides par des glycolipides non phosphatés. Cet aspect a été bien étudié chez les microalgues planctoniques de certaines régions océaniques où la concentration en Pi est relativement faible (Van Mooy et al., 2009). Ces organismes produisent une quantité de lipides non phosphatés plus importante que celle retrouvée chez les microalgues issues de régions moins limitées en Pi, témoignant ainsi d'une adaptation évolutive spécifique aux conditions du milieu (Van Mooy et al., 2009). A l'instar des plantes, le niveau de SQDG est augmenté au détriment du niveau de PG lorsque les organismes évoluent dans un environnement faible en Pi. Concernant le remodelage des lipides extraplastidiaux, une stratégie spécifique aux algues est observée et fait cette fois appel à l'utilisation des bêtaines lipides (BL) (Cañavate et al., 2017; Van Mooy et al., 2009). Ces lipides principalement retrouvés chez les algues sont généralement considérés comme d'excellents substituts aux phospholipides lors de la carence en Pi. Chez certaines algues marines telles que *Phaeodactylum tricornutum* ou *Nannochloropsis oceanica*,

la PC dégradée durant la carence peut être intégralement remplacée par des BL (Abida et al., 2015; Mühlroth et al., 2017). L'implication de ces derniers dans la réponse au déficit en Pi est détaillée dans la section III de cette introduction.

Il est important de considérer que les stratégies d'adaptation à la carence en Pi sont spécifiques à chaque espèce et l'utilisation des BL dans ces mécanismes ne s'applique pas systématiquement à tous les organismes qui en produisent (Cañavate et al., 2017) (cf. section III). Chez les microalgues, le remodelage lipidique mis en place lors de la carence en Pi est également marqué par l'accumulation des glycolipides plastidiaux pour pallier la dégradation des phospholipides (**Figure 14A**). Les ratios DGDG:phospholipides et SQDG:PG sont notamment fortement augmentés lors de la carence en Pi chez certaines espèces telles que les Chlorophytes *Tetraselmis suecica* et *Picochlorum atomus*. Chez les Straménopiles *P. tricornutum* et *Microchloropsis gaditana*, ces ratios sont également augmentés bien que le remplacement des phospholipides par les BL soit majoritaire. Des tendances inverses peuvent être observées chez l'Haptophyte *Dicranema vlikianum* et la Cryptophyte *Rhodomonas baltica*, dans lesquelles les BL restent faiblement impliqués dans le remodelage des glycolipides par rapport au DGDG (Cañavate et al., 2017). Cependant, aucun mécanisme de transport du DGDG vers les membranes extraplastidiales n'a été démontré chez ces organismes, d'autant plus que le chloroplaste y est délimité par quatre membranes. Des recherches menées chez *P. tricornutum* ont néanmoins identifié des enzymes de synthèse du MGDG et du DGDG au niveau de la membrane externe du chloroplaste. Etant donné que cette membrane est en continuité avec le réticulum endoplasmique, le transport du DGDG vers les membranes extraplastidiales pourrait être envisagé (Guéguen, 2022).

Chez les diatomées, la dégradation des phospholipides semble être réalisée par les phospholipases PLD et PI-PLC, respectivement responsables de l'hydrolyse de la PC et du PI. En effet, l'expression de ces enzymes est induite durant la carence en Pi chez les espèces *P. tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana* et *Skeletonema costatum* (Cruz de Carvalho et al., 2016; Dyhrman et al., 2012; Zhang et al., 2016). Cependant, aucune enzyme responsable de l'hydrolyse du PG n'a été identifiée chez ces organismes (Brembu et al., 2017). Les gènes responsables de la synthèse du SQDG semblent également être induits lors de la carence (Cruz de Carvalho et al., 2016; Dyhrman et al., 2012; Zhang et al., 2016).

Chez les microalgues, le remodelage lipidique déclenché par la carence de Pi est également marqué par une nette augmentation des TAG (Abida et al., 2015; Cruz de Carvalho et al., 2016; Reitan et al., 1994) (**Figure 14A**). Ces derniers semblent être principalement produits par néosynthèse, bien que les squelettes DAG issus de la dégradation des phospholipides soient également utilisés pour leur biosynthèse et leur accumulation durant les phases précoces de la carence (Brembu et al., 2017). Chez

P. tricornutum, l'augmentation des TAG est marquée par un enrichissement notable en acides gras 16:0, 16:1 et 20:5 (Figure 14C), reflétant quasi-parfaitement le profil en acides gras totaux observé dans les cellules carencées (Figure 14B). Les résultats de l'étude indiquent que le 16:1 est probablement entièrement issu de la néosynthèse des acides gras tandis que le 20:5 serait également fourni par la dégradation des phospholipides. L'implication de la dégradation des phospholipides semble cependant très minoritaire au vu de la faible proportion de 20:5 contenue dans les TAG par rapport aux acides gras néosynthétisés à 16 carbones (Abida et al., 2015).

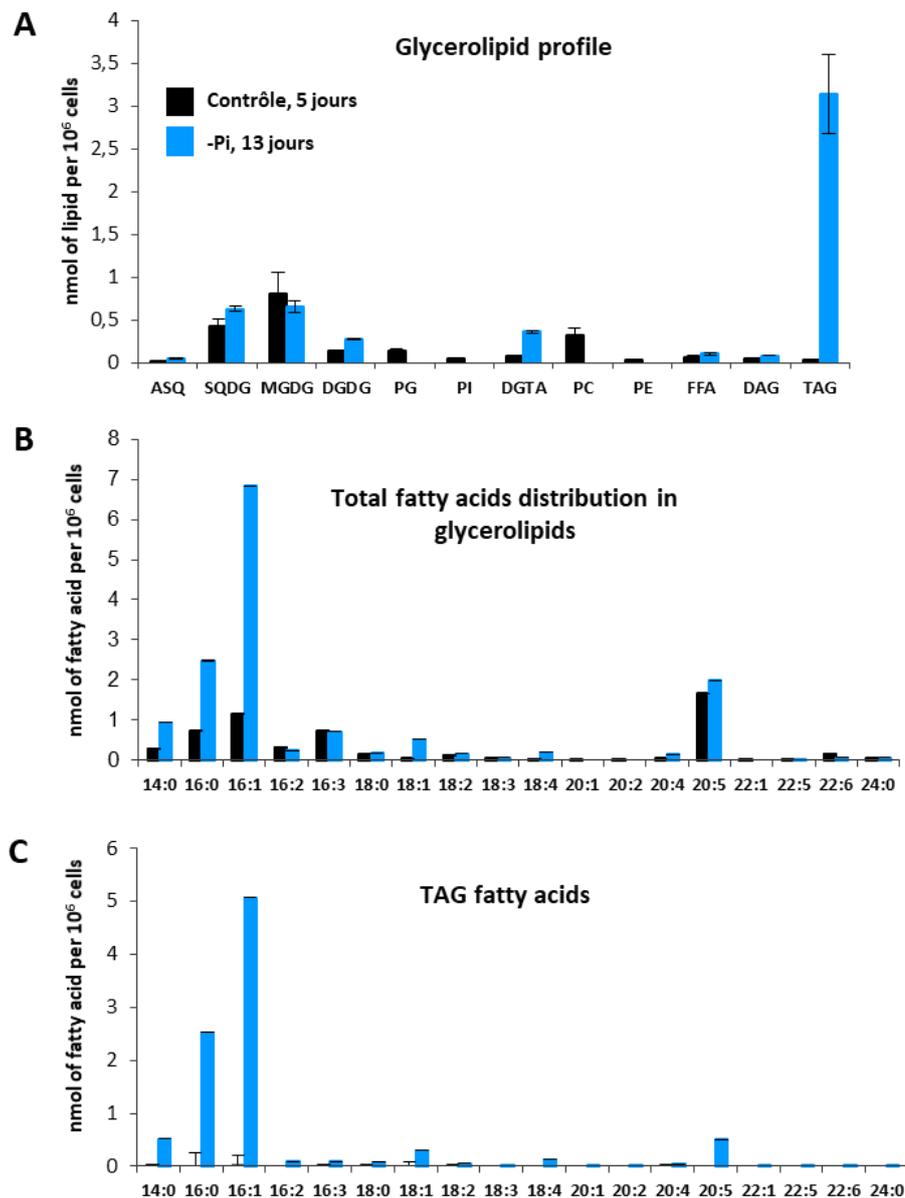


Figure 14. Remodelage lipidique en réponse à la carence en Pi chez *P. tricornutum*. Adapté de (Abida et al., 2015). Composition en glycérolipides (A), profil en acides gras totaux (B) et distribution des acides gras parmi les TAG (C) de cellules de *P. tricornutum* cultivées en conditions normales (Contrôle, noir) et en condition de carence en phosphate (-Pi, bleu). Les récoltes ont été effectuées à 5 jours pour la condition contrôle et à 13 jours pour la condition -Pi.

ASQ, Acyl-SQDG ; FFA, free fatty acid.

III. Les Bétaine Lipides : biosynthèse, fonctions et distribution

Article de revue : Betaine Lipids: Biosynthesis, Functional Diversity and Evolutionary Perspectives

Sarah Salomon¹, Océane Oliva¹, Alberto Amato¹, Olivier Bastien¹, Morgane Michaud¹ and Juliette Jouhet¹

¹ Laboratoire Physiologie Cellulaire et Végétale, Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG, Grenoble, France.

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

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

Betaine Lipids: Biosynthesis, Functional Diversity and Evolutionary Perspectives

Sarah Salomon¹, Océane Oliva¹, Alberto Amato¹, Olivier Bastien¹, Morgane Michaud¹ and Juliette Jouhet¹

¹ Laboratoire Physiologie Cellulaire et Végétale, Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG, Grenoble, France.

Abstract

Betaine lipids (BL) are relatively understudied non-phosphorus glycerolipids. They are predominantly found in algae but have also been detected in other unicellular eukaryotes, fungi, bacteria, and some bryophytes and pteridophytes. These extraplastidial lipids are considered as substitute for phospholipids in organisms, particularly under phosphate (Pi) deficiency. This review provides a broader perspective on the roles and functions of BL, revealing their functional diversity across species and environments. It also discuss the biosynthetic pathways of BL. Indeed, the pathway for DGTS (1(3),2-diacylglycerol-3(1)-O-4'-(*N,N,N*-trimethyl)-homoserine), the most widespread and studied BL form, is completely known, whereas the pathway for DGTA (1(3),2-diacylglycerol-3(1)-O-2'-(*N,N,N*-trimethyl)- β -alanine) is only partially understood. In this review, the role of the *BTA1* gene, responsible for the synthesis of DGTS, is discussed. It is revealed to be essential in DGTA synthesis as it enables the production of its intermediate, DGTS. A phylogenetic analysis, conducted on *BTA1* gene, does not seem to link the phylogenetic position of *BTA1* with the BL species produced but confirms the distribution trends, with a BL diversification in marine environments and the gradual disappearance of DGTS in the evolution of the green lineage. Further research is needed to elucidate the specific roles and biosynthetic pathways of BL across different species.

Keywords

Betaine lipids, glycerolipids, plants, algae, phosphate starvation, evolution

1. Introduction

Glycerolipids are key structural and functional components of cellular membranes. In photosynthetic organisms, membrane glycerolipids can be categorized into three main classes: phospholipids, glycolipids and betaine lipids (BL). Phospholipids are predominantly found in the endomembrane system and mitochondria whereas glycolipids are primarily located in the chloroplast membranes. While the former classes are ubiquitous among photosynthetic organisms, the same cannot be said for BL, which exhibit a more specific distribution. BL are a poorly known class of glycerolipids present in algae, some fungi, bacteria and some bryophytes and pteridophytes. To date, three BL species have been described: DGTS (diacylglyceryl trimethylhomoserine), DGTA (diacylglyceryl-hydroxymethyl-trimethylalanine) and DGCC (diacylglyceryl carboxyhydroxymethylcholine). These compounds have been identified in a large number of organisms and characterized as both functional and structural lipids, although many uncertainties remain regarding their synthesis, functions and distribution. Their discovery in the seventies was relatively recent compared to that of phospholipids, which have been the subject of more extensive research. As BL do not contain phosphorus, they are generally accepted as substitutes for phospholipids and few studies contributed to the understanding of their specific biological relevance.

The role of BL as substitutes for phospholipids has been specifically studied in the context of organisms' adaptation to phosphate (Pi) deficiency. These mechanisms have notably been reported within phytoplankton communities of certain oligotrophic oceanic regions characterized by low phosphorus concentration [1]. In these organisms, BL synthesis appeared to increase in response to Pi limitation to replace the degraded phospholipids [1–5]. However, the dynamics of BL synthesis in such conditions vary among species and seem to be implicated in other abiotic stresses, such as nitrogen starvation or cold temperatures [2,6–8]. Thus, the synthesis of BL seems indicative of a specific adaptation to environmental conditions. Although their distribution and proportions in species are highly variable and poorly understood, some research has shown that habitat could play a significant role in these aspects [9]. The progressive disappearance of BL during plant evolution also supports this hypothesis [10].

This review covers the current knowledge of the structural and metabolic functions of BL in organisms. Additionally, BL biosynthetic processes are reviewed, including new findings regarding DGTA specific pathway. Finally, the distribution of BL across species is discussed, along with a phylogenetic analysis of a gene involved in their synthesis.

2. Discovery and structure

Betaine lipids structure is characterized by a specific polar head composed by a derivative of a hydroxyamino acid linked through an ether bond to a diacylglycerol at the *sn*-3 position of the glycerol moiety. These compounds are zwitterionic at neutral pH due to the presence of a negatively-charged carboxyl group and a positively-charged trimethylated ammonium group in their polar head [11] (Figure 1). DGTS and DGTA were discovered in 1969 in lipid extracts from the stramenopile *Ochromonas danica* [12]. These two compounds were first mentioned as unknown lipids before the elucidation of their chemical structure in 1974 for DGTS [13] and in 1990 for DGTA [14]. DGTS was described as 1(3),2-diacylglyceryl-3(1)-*O*-4'-(*N,N,N*-trimethyl)-homoserine and DGTA as 1(3),2-diacylglyceryl-3(1)-*O*-2'-(*N,N,N*-trimethyl)- β -alanine (Figure 1). It is interesting to note that the position of the carboxyl group in DGTS and DGTA polar heads differs from one carbon to the next, making these

two lipids structural isomers. Further studies isolated DGTS in several taxonomic groups like green algae [15–17], pteridophytes [18], bryophytes [19], bacteria [20] and fungi [21], whereas DGTA was mostly identified in phaeophyceae [22]. The third betaine lipid class, DGCC, was first described in 1994 as 1,2-diacylglyceryl-3(1)-*O*-carboxy-(hydroxymethyl)-choline from the haptophyte *Diacronema lutheri* [23]. Its structure can be distinguished from DGTS and DGTA by the presence of an acetal carbon at the origin of the carboxyl group (Figure 1). DGCC was detected in other haptophyte species and seemed to be restricted to this clade [24]. Since their discovery, BL have been identified in a broadening array of species through to the development of physicochemical detection methods based on mass spectrometry [11]. DGTS is the most widespread BL among organisms due to its detection in several distant phylogenetic groups. Further details on BL distribution are discussed in section 5.

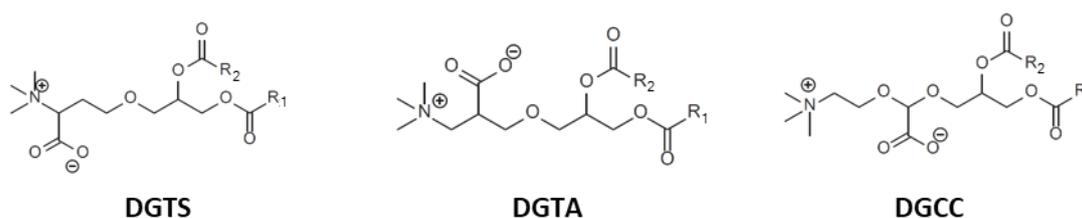


Figure 1: Structure of the three known betaine lipids (DGTS :1(3),2-diacylglyceryl-3(1)-*O*-4'-(*N,N,N*-trimethyl)-homoserine, DGTA : 1(3),2-diacylglyceryl-3(1)-*O*-2'-(*N,N,N*-trimethyl)-β-alanine, DGCC : 1,2-diacylglyceryl-3(1)-*O*-carboxy-(hydroxymethyl)-choline). Adapted from [25]. R1 and R2 correspond to the fatty acid esterified at the *sn*-1 and *sn*-2 positions, respectively.

3. BL functions

3.1. Membrane structural role

The initial studies presented BL as major lipid components of extraplastidial membranes. These lipids can represent a high portion of polar lipids composition. In *O. danica*, DGTS and DGTA account for almost 50% of the total glycerolipids, with DGTS being the most abundant [26]. In the phaeophyceae *Fucus vesiculosus*, DGTA also represents the highest percentage among glycerolipids [27]. From a general point of view, BL are thought to be abundant in species with low levels of phospholipids, while being less prevalent in species producing high amounts of phospholipids. A negative correlation between DGTA and phosphatidylcholine (PC) content was suggested in several studies on phaeophyceae [22,28,29]. This trend was also reported concerning the relative proportions of DGTS and PC in fungi, bryophytes and green algae [30–32], although no quantitative correlation was detected between the amounts of these two lipids [30]. The inverse relationship between PC and BL is particularly evident in organisms that produce BL to the total exclusion of PC, such as the haptophyte *D. lutheri* or the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [16,33]. Based on these findings, it has been generally accepted that BL replace phospholipids as major membrane constituents, especially regarding DGTS and PC. These two lipids have a similar structure and seem to have a connected evolution since PC progressively replaced DGTS during the evolution of the green lineage [10]. It has been suggested that these lipids fulfill similar functions [34–36] and can be interchangeable, as shown by [37] in an engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing DGTS instead of PC. This study demonstrated that DGTS production had no negative impact on the membrane biogenesis or the yeast growth, suggesting that DGTS could perfectly substitute to PC in this organism [37]. However, certain doubts have been raised regarding the interchangeable nature of DGTS and PC. In green lineage organisms, DGTS and PC do not share the same fatty acid composition and may therefore play different

roles [32]. A recent study on artificial membranes also questioned DGTS and PC substitutability, showing that these two lipids have different physical properties [9]. DGTS bilayers were shown to be thicker and more sensitive to hydration than bilayers composed of PC, likely due to the differences in their polar head structure. It was proposed that coexistence of DGTS and PC in the same membrane can be achieved by changing the fatty acid composition between these two lipids, thereby restoring the membrane thickness. This mechanism is proposed to occur in marine organisms in which DGTS is enriched in very-long chain polyunsaturated fatty acids (VLC-PUFAs) in comparison to PC [9]. This fatty acid composition change may not apply to freshwater or terrestrial organisms that produce only medium-chain fatty acid and no VLC-PUFAs. In this situation, DGTS and PC might not be good substitutes for each other because membrane properties and thickness cannot be maintained. This could explain weak coexistence of DGTS and PC observed in the green lineage [9]. Indeed, freshwater organisms with significant betaine lipids usually have little or no PC [32]. Even some algae contain only betaine lipids and no PC such as *Chlamydomonas reinhardtii* whereas some other do not contain betaine lipid and only PC such as *Chlorella sorokinia* [38,39].

3.2. Role in the lipid metabolism

Apart from their structural role in membranes, BL have also been studied for their involvement in the lipid metabolism. Once again, they are thought to function similarly to PC as acyl carriers for fatty acid editing and subsequent lipid synthesis. This hypothesis is well developed in [40], with a comparison of what is known about acyl editing on PC in land plants and the evidence for acyl editing of betaine lipids. Prior ¹³C-labeling studies have demonstrated that DGTS contributes substantial fatty acid flux toward TAG synthesis [41]. However, the mechanism by which betaine lipids contributes to TAG accumulation likely differs from that of PC. Indeed, since phospholipase D and C act on the phosphate moiety absent in betaine lipids, they are not expected to be active on this lipid class. Furthermore, enzymes capable of breaking the ether bond linking the betaine polar head to the glycerol backbone have not yet been identified, but they are presumed to exist in order for cells to catabolize DGTS.

In plant, PC is known to participate in the synthesis of plastidic lipids via the “eukaryotic pathway”. PC acts initially as a substrate for the desaturation of oleic acid (18:1) into linoleic acid (18:2) before its degradation into diacylglycerol (DAG), which is converted into monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) within the chloroplast [42]. As many algae contain little or no PC, BL were thought to play a similar role [40,43]. Labelling experiments in *C. reinhardtii* and *O. danica* showed that DGTS was a substrate for oleic acid desaturations, leading to the production of 18:2, 18:3 and 18:4 fatty acids [26,34,35]. Similar observations were noted for DGTA in *O. danica* and *F. vesiculosus* [26,27]. In accordance with these studies, BL were suggested to redistribute saturated acyl chains for the synthesis of other polar lipids, notably MGDG [44]. Pulse chase experiments indicated that 18:1 and 18:2 fatty acids were transferred from DGCC to MGDG in *D. lutheri* [43]. This hypothesis was also supported in *C. reinhardtii* and *Dictyopteris membranacea* concerning DGTS and DGTA, respectively [34,44]. In *M. gaditana*, 20:5 fatty acid (eicosapentaenoic acid or EPA) from DGTS was proposed to be imported to the plastid for MGDG formation through the “omega pathway” [45]. In *P. tricornutum*, mutants affected in plastidial desaturation exhibited higher amounts of EPA and extraplastidial glycerolipids including DGTA. These results suggest that DGTA might play a role in the omega pathway as a desaturation platform for EPA production and import into the chloroplast [46]. However, these recent studies provided only indirect evidence for BL contribution to MGDG synthesis. In marine algae, BL are primarily regarded as final acceptors for VLC-PUFAs, including the high valuable EPA and 22:6 fatty acids (docosahexaenoic acid or DHA) [47–51]. BL have also been reported to be actively involved in the lipid metabolism under certain stress conditions; this last point is discussed in the following sections 3.3 to 3.5.

3.3. *Adaptation to phosphate deficiency*

The involvement of BL in adaptation to phosphate deficiency has been well documented since the 2000s. The first discovery of betaine lipid accumulation during phosphate starvation was made in *Rhodobacter sphaeroides* by Benning et al., [20]. As mentioned before, BL are generally considered as substitutes for phospholipids, especially under phosphate scarcity. Since they do not contain phosphorus, they seem specifically adapted to replace phospholipids in extraplastidial membranes, allowing organisms to lower their phosphorus demand and maintain their cellular growth. This mechanism was first illustrated in eukaryotic phytoplankton living in oligotrophic regions of the ocean [1]. These organisms were able to substitute PC and phosphatidylethanolamine (PE) by BL in response to phosphate starvation [1]. Similar observations were recorded in other marine microalgae such as the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [2,52] and several green algae including *Ostreococcus tauri* [4,5]. In these organisms, the level of DGTA significantly increased under phosphate-starved conditions, concomitant with a decrease in phospholipid levels. The same trend was observed concerning DGTS behaviour in the eustigmatophytes *Nannochloropsis oceanica* and *Microchloropsis gaditana* [4,53,54], as well as in the green alga *Picochlorum atomus* [4]. Apart from marine organisms, DGTS was also shown to be accumulated under phosphate limitation in bacteria [20,55], snow algae [56] and fungi [37]. In addition to its role as a structural substitute for phospholipids under phosphate starvation, DGTS was also suggested to replace phospholipids metabolic functions in this condition. In *N. oceanica*, DGTS was proposed to serve as an acyl carrier for C₁₈ fatty acids desaturation during phosphate starvation, as PC in normal conditions. DGTS could also provide EPA acyl chains to produce chloroplastic lipids and triacylglycerol (TAG) [53]. In the eustigmatophyte *Monodus subterraneus*, DGTS was shown to replace PE as a substrate for C₂₀ fatty acids desaturation in response to phosphate starvation. It was suggested that DGTS acyl chains were subsequently incorporated into chloroplastic digalactosyldiacylglycerol (DGDG), as PE under standard conditions [57]. However, no change was observed in PC level in this organism [57].

The previously mentioned species were shown to increase their BL content during phosphate limitation, while producing basal level of BL under normal conditions. Some organisms seem to have evolved differently in this adaptation process by synthesizing BL only in nutrient deprivation. This is the case for the green alga *Chlorella kessleri*, in which the gene involved in DGTS synthesis is specifically induced under phosphate-deficient conditions [58]. In the haptophyte *Emiliania huxleyi*, DGCC synthesis also appears to occur solely under phosphate limitation [59]. A different evolutionary strategy can be observed in other organisms, in which BL are constitutively produced and reflect the low-phosphate environmental content. This phenomenon has been documented in some Icelandic bryophytes, where DGTS large distribution seems to be an intrinsic response to the low phosphorus levels in Iceland [31]. Conversely, the BL level may be independent of phosphate availability, as shown in several marine haptophytes in which betaine lipid amount did not increase during phosphate starvation [3,4,60]. In these species, phospholipids are intrinsically not abundant and do not seem to be involved in phosphate-induced lipid remodelling. In this case, BL can be considered major membrane components rather than substitute lipids under certain stress conditions. Thus, BL role in phosphate starvation cannot be assumed in every species [4].

3.4. Adaptation to nitrogen deficiency

BL involvement in the nitrogen limitation response has been discussed in a few studies on microalgae. Contrary to the phosphate deprivation response where phospholipids are specifically used as phosphorus storage, nitrogen stress does not imply the recycling of membrane lipids despite the presence of nitrogen in BL, PE and PC. The lipid remodeling due to nitrogen deprivation rather implies the use of acyl chains from glycerolipids for TAG accumulation, in addition to the *de novo* synthesized fatty acids. The role of glycerolipids in this mechanism seems to be mostly attributed to MGDG in nitrogen-deprived algae [2,6,61], even if some studies evoked the role of BL in this response. In the haptophyte *Tisochrysis lutea*, DHA from DGTS was suggested to contribute to TAG synthesis upon nitrogen depletion [3]. Similar observations were reported in *P. tricornutum* [62] but most of the studies have been conducted in *C. reinhardtii*. In this organism, DGTS seems to be a major source of fatty acids for TAG formation, in addition to MGDG and DGDG [36,63,64]. It seems that only specific molecular species of DGTS are involved in this process, notably DGTS 16:0/18:3, which contributes to 18:3 accumulation in TAG [65,66]. Contrary to MGDG, DGTS glycerol backbone does not appear to participate in TAG formation and instead undergoes deacylation to redistribute fatty acids [67]. This could explain why the overall DGTS content is weakly affected under nitrogen limitation [6,36].

3.5. Adaptation to low temperatures

Low temperatures are known to induce an increase in fatty acid desaturation within glycerolipids [68]. This mechanism allows the maintenance of membrane fluidity and plays a key role in the acclimation of plants and algae to cold environment [69]. A first study on *D. lutheri* reported BL involvement in this process [70]. At 15°C, DGTS increased four-fold compared to cells grown at 25°C, with an enrichment in VLC-PUFAs such as EPA and DHA [70]. In *N. oceanica*, DGTS was also shown to be accumulated at lower temperatures [7,8]. Contrary to PC, the EPA content in DGTS and MGDG strongly increased in cold conditions, at the expense of 16:0 and 16:1 fatty acids. These results suggest the specific role of DGTS as an important stock of EPA in extraplasmidial membranes, in coordination with MGDG in the chloroplastic compartment [7]. The absence of DGTS synthesis in a mutant strain of *N. oceanica* led to a reduction in cellular growth and EPA content at low temperatures [8]. These observations further support the crucial role of DGTS in temperature tolerance in this organism. The potential role of BL in cold stress acclimation remains poorly investigated in other species.

4. BL biosynthesis

The biosynthesis of BL has been explored in several studies but remains partially understood. DGTS is the only BL for which the entire pathway is known. Some hypotheses have been proposed concerning DGTA synthesis and there is no existing knowledge regarding DGCC. In the following sections 4.1 and 4.2, we will discuss DGTS synthesis discovery and current explorations into DGTA pathway.

1. DGTS biosynthesis

In vivo labeling experiments in *C. reinhardtii* first demonstrated that methionine was a precursor for DGTS synthesis. Radiolabeled L-methionine was incorporated into both homo-Serine moiety and *N*-methyl units of the DGTS headgroup [71]. Similar experiments confirmed these observations in the bryophyte *Marchantia polymorpha* [72], the algae *O. danica* and *Cryptomonas* [26,73] and the

bacterium *Rhodobacter sphaeroides* [74]. Methionine was then revealed to originate from S-adenosyl-L-Methionine (SAM), which contributed to both homo-Serine and methyl moieties of the DGTS headgroup [75]. The elucidation of DGTS pathway progressed further with the identification of the genes involved in DGTS formation in bacteria. Mutants of *R. sphaeroides* were used to identify an operon containing *btaA* and *btaB*, two essential genes for DGTS synthesis [76]. *btaA* was proposed to encode an S-adenosylmethionine:diacylglycerol 3-amino-3-carboxypropyl transferase, responsible for the attachment of the homo-Serine moiety to a DAG backbone. *btaB* was proposed to catalyse the next three methylation steps as an S-adenosylmethionine-dependent N-methyltransferase (Figure 2) [76]. These results provided the first evidence of the two-step formation of DGTS from a presumed DAG substrate, with the use of SAM in both reactions. The BtaA and BtaB enzymes from *R. sphaeroides* (BtaA_{RS} and BtaB_{RS}) were then characterized by heterologous expression in *Escherichia coli*, which does not produce DGTS in natural conditions. The co-expression led to DGTS formation and confirmed DGTS pathway in *R. sphaeroides* [77]. On the basis of protein similarity, eukaryotic orthologs of BtaA_{RS} and BtaB_{RS} were found in a subsequent study in *C. reinhardtii* [78]. The *C. reinhardtii* BTA1 gene (BTA1_{Cr}) was identified and suggested to encode a bifunctional protein sufficient for DGTS synthesis. BTA1_{Cr} protein was shown to carry the two catalytic domains BtaA-like and BtaB-like, presumed to be functional homologs of BtaA_{RS} and BtaB_{RS}, respectively (Figure 2) [78]. Enzymatic characterization of each domain validated this hypothesis, suggesting that eukaryotic BTA1 protein carries out the entire pathway of DGTS formation. Binding sites to SAM were also identified in both domains and proved essential for enzyme activity [78]. Eukaryotic BTA1 homologs were then identified in several fungi [37,79,80] and algae [8,58]. It is interesting to note that the arrangement of the domains on the eukaryotic BTA1 protein can be of two types, namely type A characterized by a BtaB-BtaA domain, and type B for which the arrangement is opposite [8]. A phylogenetic analysis revealed that type A BTA1 was predominant in freshwater organisms while type B was more prevalent among marine organisms, suggesting a correlation between habitat and BTA1 configuration [9]. Moreover, it is interesting to note that the BTA1 gene sometimes exists in two copies within the genome. In *N. oceanica*, a short version of BTA1, which contains only the BtaB domain, is present in addition to the full-length BTA1 gene [8]. However, so far, no enzymatic data except the primary works from Riekhof [77,78] are available on the different configurations of BTA1. It would be interesting to compare activities of different isoforms and to see if AlphaFold prediction together with evolutionary data offer any insight on this particular organization of the two domains.

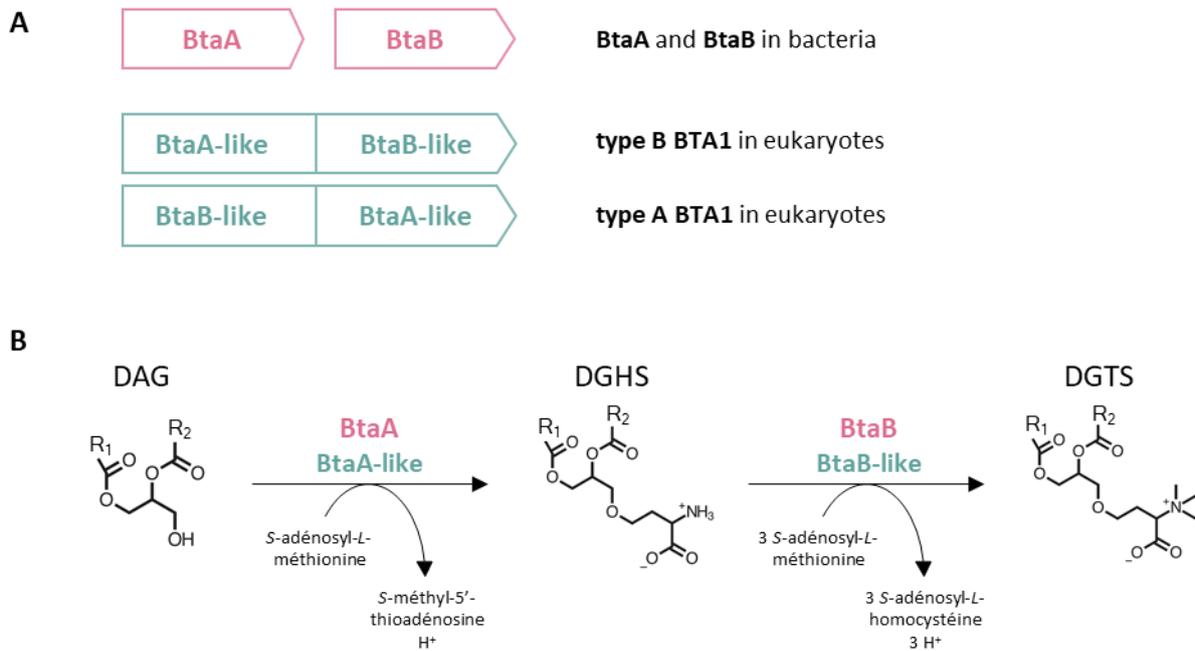


Figure 2: DGTS biosynthesis in organisms. **A.** Protein domains organisation. BtaA-like and BtaB-like domains of BTA1 proteins are respective homologs of bacterial BtaA and BtaB proteins. Two configurations are found in eukaryotes, type A and type B, corresponding to different organization of the BtaA-like and BtaB-like domains. **B.** DGTS biosynthetic pathway in bacteria (pink) and eukaryotes (green). DAG, diacylglycerol; DGHS, diacylglycerylhomoserine. Adapted from (Riekhof et al., 2014).

Cell fractionation and immunomicroscopy studies conducted on the pteridophyte *Lycopodium annotinum* and the algae *C. reinhardtii* and *O. danica* provided initial evidence of DGTS subcellular localization [30]. DGTS occurred mainly in non-plastidial structures, suggesting its presence in the ER [30]. In accordance with these results, BTA1 synthesis pathway was presumed to occur in the endoplasmic reticulum (ER) in *C. reinhardtii* [78]. Fluorescence microscopy experiments further confirmed the ER localization of BTA1 enzyme in the fungus *Fusarium graminearum* [81]. Positional distribution of fatty acids has also been used to investigate the site of DGTS synthesis. A large number of viridiplantae species possess unsaturated C₁₈ fatty acids at the *sn*-2 position of DGTS glycerol backbone [28]. This composition being representative of lipids synthesized through the eukaryotic pathway, DGTS was assumed to be produced in the ER [28]. Similar conclusions were reported in *C. kessleri* and *C. reinhardtii*, in which *sn*-2 position of DGTS is occupied almost exclusively by C₁₈ unsaturated fatty acids [38,58,82]. Enzymatic test in *C. reinhardtii* organelles also confirmed this hypothesis, showing that DGTS synthesis activity was associated with the ER [75]. Moreover, the fatty acid composition of DGTS synthesized in response to Pi starvation was shown to be similar to that of PC and PE in *C. kessleri*, indicating that DGTS might be partially synthesized from degraded PC and PE in the endoplasmic reticulum [58]. However, some of the DGTS content in *C. reinhardtii* was reported to be located within the chloroplast [36], raising the possibility of a potential DGTS transport in the chloroplastic compartment.

2. DGTA biosynthesis

Early studies tried to decipher DGTA biosynthetic pathway after the elucidation of its chemical structure [83]. DGTA being a structural isomer of DGTS, it has been suggested that the synthesis of both lipids was linked. Pulse-chase labeling experiments in *Cryptomonas* first demonstrated that the C-3 and C-4 carbons of DGTS were incorporated into DGTA polar head, suggesting the potential role of DGTS as a precursor for DGTA formation [47]. Similar experiments in *O. danica* confirmed this hypothesis and postulated that DGTS conversion to DGTA occurred through modifications in DGTS polar head. The carboxyl group of DGTS might be removed and replaced by a new one onto the adjacent carbon through a sequential process of decarboxylation and carboxylation (Figure 3A) [26]. In contrast, the notable differences between the DGTS and DGTA fatty acid compositions indicate a potential remodelling of acyl chains. In *O. danica*, DGTA is mainly composed of C₂₀ and C₂₂ fatty acids, while DGTS predominantly contains C₁₄ and C₁₈ fatty acids. A complete exchange of acyl groups through deacylation and re-acylation was then predicted during DGTS conversion to DGTA [26]. These differences in the fatty acid molecular distributions are also found in other species, in which high VLC-PUFAs content is characteristic of DGTA rather than DGTS [33,84].

More recently, the hypothesis of DGTS conversion to DGTA has gained support with genetic and transcriptomic analyses. In the fungus *Cryptococcus neoformans*, the *BTA1* gene mutation resulted in a decrease in both DGTS and DGTA production [80]. In *P. tricornutum*, which only produces DGTA, a putative *BTA1* gene was identified and shown to be overexpressed during phosphate starvation, resulting in an increase in DGTA synthesis [85]. This last result suggests that the *BTA1* gene in DGTA producing organisms is present and actively involved in the metabolism, probably allowing the production of DGTS followed by its complete conversion into DGTA. In *Cryptomonas* and *O. danica*, the amount of DGTA was shown to be governed by the rate of DGTS transformation to DGTA, which seemed to be faster under a high DGTA/DGTS cellular ratio. It was then expected that DGTS conversion to DGTA occurred even more rapidly in organisms producing only DGTA, thus explaining the absence of DGTS detection [26]. The putative *BTA1* gene from the DGTA producing diatom *P. tricornutum* (Phatr3_J42872), initially identified by [85], was expressed in the plant *N. benthamiana* and resulted in DGTS production (Figure 3B) [86]. This new result confirms the functionality of *BTA1* enzyme as a DGTS synthase and not as a DGTA synthase. Moreover, lipidomics analyses of *P. tricornutum* *BTA1* knock-out mutants revealed the suppression of DGTA production (Figure 3C and Supplementary Methods section 7.1). This further demonstrates the involvement of *BTA1* in DGTA synthesis by the production of DGTS as an intermediate.

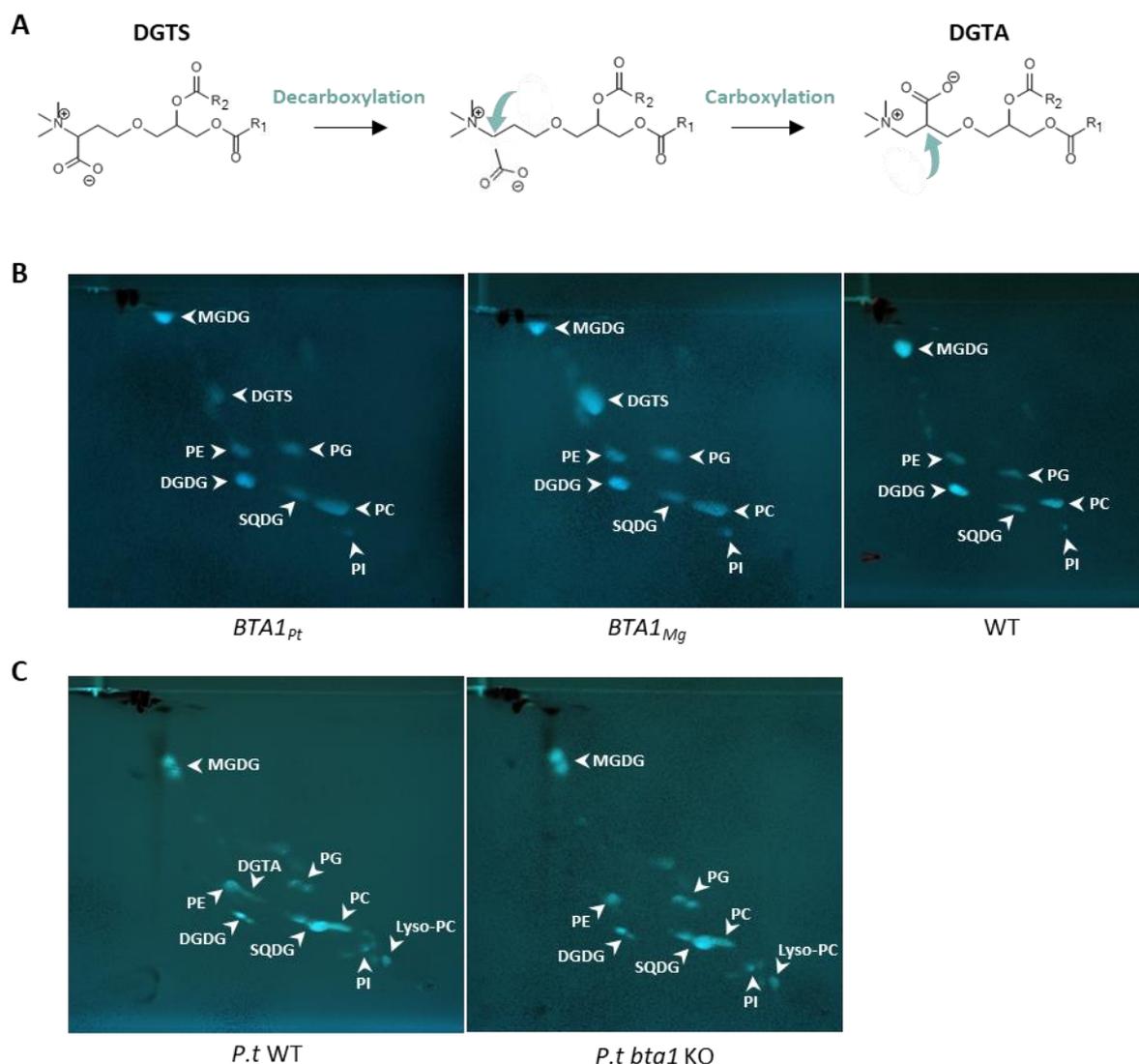


Figure 3: DGTA biosynthesis. **A.** Hypothetical conversion of DGTS into DGTA. **B.** Separation by TLC of the glycerolipids from *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with BTA1 gene of *P. tricornutum* (BTA1_{Pt}) and *Microchloropsis gaditana* (BTA1_{Mg})(Naga_100016g36). BTA1_{Mg} was used as a control of a DGTS producing organism. WT: wild type. **C.** Separation by TLC of the glycerolipids from *P. tricornutum* wild-type (WT) and KO mutant of BTA1 gene (Phatr3_J42872)(*P.t bta1 KO*). TLC analysis was performed as described in (Abida et al., 2015). SQDG: sulfoquinovosyldiacylglycerol, DGDG: digalactosyldiacylglycerol, PG: phosphatidylglycerol, PI: phosphatidylinositol. TLC: Thin Layer Chromatography.

5. BL distribution and evolution

1. BL distribution among organisms

The literature has been reviewed in order to gain insight into the global distribution of BL in species. BL producing organisms were gathered and classified based on their phylogenetic affiliation, with the aim to provide an overview of the main groups in which each type of BL is found. The resulting list is presented in [Table 1](#). Because DGTS and DGTA are structural isomers, both molecules can be confounded if mass spectrometry analysis is used and performed solely on the 236 fragment [87]. Furthermore, as described above, DGTA synthesis pathway is not fully known and relies on the

presence of *BTA1*. Sometimes, by genomic analysis, organisms are described as DGTS producers when *BTA1* is detected. This can lead to uncertainties in the detection of DGTS and DGTA in organisms such as *P. tricornutum* [62]. Thus, the selection of organisms presented here took into account the method used for BL detection, which is either performed by thin layer chromatography (TLC) analysis [88] or by mass spectrometry with the identification of DGTS or DGTA specific fragments [89,90]. Finally, it is important to consider that, unlike other pathways with identified synthesis genes, research for BL detection cannot rely on genomic analyses like high-throughput transcriptomics. Since BL can only be revealed by metabolic analyses, their reported detection in the literature may not fully cover the actual extent of their distribution within organisms.

As previously mentioned, DGTS is the BL the most widely distributed among the organisms, with a representation in marine, freshwater and terrestrial ecosystems. It is detected in taxonomically diverse and distant groups, including plants, green algae, fungi, bacteria, Chromista and Amoebozoa (Table 1). Several publications listed a significant number of DGTS producing organisms around the 1990s, notably in plants such as Bryophytes and Pteridophytes [18,28,30,32,91] and in various algae and fungi [15,30,32,92]. Among algae, DGTS seems to be characteristic of the green lineage, with a high representation in Chlorophyta and Rhodophyta. DGTS was also detected in numerous chromista marine organisms such as Cryptophytes and Haptophytes (Table 1), although it appears to be excluded from certain groups within chromista such as phaeophyceae [29]. Because of its widespread distribution and hypothetical involvement in DGTA synthesis, DGTS was speculated to be the first BL to appear during evolution [30]. Bolik et al. (2023) [9] also supported this hypothesis, suggesting that DGTA and DGCC could have been acquired later in the evolution in marine organisms. As discussed above, DGTS and PC are considered as good substitutes for each other in marine species, allowing the replacement of one lipid by the other depending on the phosphate availability. The selection pressure on DGTS in marine organisms was therefore different than the one exerted in freshwater organisms, where the coexistence of PC and DGTS is rare and results in the predominance of one lipid over the other. This could have led marine species to diversify their BL production through the emergence of DGTA and DGCC [9]. On the contrary, it is possible that DGTS remained the only BL produced in freshwater organisms and all species that emerged from the green lineage. DGTS has been progressively replaced by PC during the evolution of plants and is completely absent in vascular plants [10,18,30,48], suggesting its gradual loss during plant terrestrialization. The evolution of the tracheophytes is marked by the loss of vegetative desiccation tolerance [93] and it seems that DGTS disappearance occurred concomitantly with this event [9]. DGTS is detected in tracheophytes but several studies reported that this lipid was degraded during drought periods in these organisms [94–96], suggesting that DGTS might be deleterious in terrestrial environments where water is limiting. Thus, the losses of DGTS production and desiccation tolerance might be linked and could explain why seed plants do not synthesize DGTS [9].

DGTA was initially identified in a significant number of phaeophyceae species (Table 1) and described as a characteristic lipid of this group, although certain suborders lack DGTA [22,28–30]. DGTA was also detected in other Stramenopiles like Dinoflagellates, as well as in Cryptophytes and Haptophytes (Table 1). Most of these species live in marine environments, with the exception of several freshwater organisms such as *O. danica* and *Cryptomonas* CR-1 (Table 1). Despite the overrepresentation of DGTS in the green lineage, DGTA was reported in a few green algae species like *O. tauri* and *Micromonas pusilla*. Apart from the Chromista and green algae groups, DGTA was also detected in the fungus *Cryptococcus neoformans*, which also produces DGTS, and in the Euglenozoa *Diplonema papillatum*, a marine eukaryote (Table 1). Thus, DGTA appears to be primarily distributed among marine Chromists. Although it has been detected in some species more phylogenetically distant, the distribution of DGTA

remains much less extensive than that of DGTS. These observations are consistent with the hypothesis that DGTS is the most primitive BL. DGTA synthesis could have been acquired later in the evolution in certain DGTS producing organisms [9], as DGTS was shown to be involved in DGTA synthesis. This could have led to the emergence of organisms producing both DGTS and DGTA or DGTA only (Table 1).

DGCC distribution seems to be even more restrictive than that of DGTA, as it is detected only in marine Chromist species (Table 1). This lipid was first detected in several Haptophytes before being identified in other representatives of the SAR (Stramenopiles, Alveolates, Rhizaria) supergroup, such as Chlorarachniophytes [87], Dinophyceae and diatoms [90] (Table 1). It is interesting to note that DGCC is often found in combination with DGTS or DGTA. It can also be produced with both DGTS and DGTA, although DGCC was usually detected in small amounts in this case [87]. Because the genes involved in DGCC synthesis are not known, no phylogenomic study could be achieved.

Species name	Classification	Taxonomy ID	Reference	Habitat	DGTA	DGTS	DGCC
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid52969	Jones and Harwood, 1992 [97]	marine water	x		
<i>Bigelowiella natans</i>	Chromista, Rhizaria	NCBI:txid227086	Roche and Leblond, 2010 [87]	marine water	x	x	x
<i>Calyptrosphaera sphaeroidea</i>	Chromista, Haptophyta	NCBI:txid35139	Kato <i>et al.</i> , 1996 [24]	marine water			x
<i>Chattonella antiqua</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid859642	Sato <i>et al.</i> , 1987 [98]	marine water		x	
<i>Chroomonas placoidea</i>	Chromista, Cryptophyceae	NCBI:txid173977	Cañavate <i>et al.</i> , 2016 [99]	marine water	x		
<i>Chroomonas salina</i>	Chromista, Cryptophyceae	NCBI:txid402395	Eichenberger <i>et al.</i> , 1996 [100]	marine water	x		
<i>Conticribra weissflogii</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid1577725	Li <i>et al.</i> , 2016 [101]	brackish water			x
<i>Cryptomonas strain CR-1</i>	Chromista, Cryptophyceae		Sato, 1991 [47]	marine, brackish and freshwater, terrestrial	x	x	
<i>Diacronema vlkianum</i>	Chromista, Haptophyta	NCBI:txid70452	Armada <i>et al.</i> , 2013 [90]	marine and freshwater	x	x	x
<i>Dictyota dichotoma</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid2876	Araki <i>et al.</i> , 1991 [22]	marine water	x		
<i>Emiliana huxleyi</i>	Chromista, Haptophyta	NCBI:txid2903	Shemi <i>et al.</i> , 2016 [59]	marine water		x	x
<i>Fucus vesiculosus</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid49266	Jones and Harwood, 1992 [97]	marine water	x		
<i>Gomphonema parvulum</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid97227	Künzler and Eichenberger, 1997 [102]	marine water	x		
<i>Gymnochlora stellata</i>	Chromista, Rhizaria	NCBI:txid67809	Roche and Leblond, 2010 [87]	marine water	x	x	x
<i>Hizikia fusiformis (or Sargassum fusiforme)</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid590727	Araki <i>et al.</i> , 1991 [22]	marine water	x		
<i>Ishige okamurai</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid233772	Araki <i>et al.</i> , 1991 [22]	marine water	x		
<i>Isochrysis galbana</i>	Chromista, Haptophyta	NCBI:txid37099	Cañavate <i>et al.</i> , 2017 [60]	marine water		x	x
<i>Microchloropsis gaditana</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid72520	Cañavate <i>et al.</i> , 2016 [99]	marine water		x	
<i>Monodus subterraneus (or Monodopsis subterranea)</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid44434	Khazin-Goldberg and Cohen, 2006 [57]	freshwater		x	
<i>Nannochloropsis granulata</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid43926	Banskota <i>et al.</i> , 2013 [49]	marine water		x	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid1259847	Li <i>et al.</i> , 2014 [50]	marine and brackish water		x	
<i>Ochromonas danica</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid2986	Vogel and Eichenberger, 1992 [26]	freshwater	x	x	
<i>Pachydictyon coriaceum (or Dictyota coriacea)</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid499617	Araki <i>et al.</i> , 1991 [22]	marine water	x		
<i>Padina arborescens</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid200423	Araki <i>et al.</i> , 1991 [22]	marine water	x		
<i>Diacronema lutheri (or Pavlova lutheri)</i>	Chromista, Haptophyta	NCBI:txid2081491	Kato <i>et al.</i> , 1995 [33]	marine water	x		x
<i>Phaeodacylum tricornutum</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid2850	Abida <i>et al.</i> , 2015 [2]	marine water	x		
<i>Prorocentrum micans</i>	Chromista, Alveolata	NCBI:txid2945	Kato <i>et al.</i> , 1996 [24]	marine water			x
<i>Pseudoisochrysis paradoxa</i>	Chromista, Haptophyta	NCBI:txid185006	Armada <i>et al.</i> , 2013 [90]	marine water		x	x

Species name	Classification	Taxonomy ID	Reference	Habitat	DGTA	DGTS	DGCC
<i>Rhodomonas baltica</i>	Chromista, Cryptophyceae	NCBI:txid295837	Cañavate <i>et al.</i> , 2016 [99]	marine water	x		
<i>Sargassum horneri</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid74089	Araki <i>et al.</i> , 1991 [22]	marine water	x		
<i>Sargassum ringgoldianum</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid127524	Araki <i>et al.</i> , 1991 [22]	marine water	x		
<i>Sargassum thunbergii</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid127542	Araki <i>et al.</i> , 1991 [22]	marine water	x		
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Chromista, Stramenopile, Ochrophyta	NCBI:txid35128	Martin <i>et al.</i> , 2011 [103]/Cañavate <i>et al.</i> , 2016 [99]/Hunter <i>et al.</i> , 2018 [104]	marine water		(x)	x
<i>Tisochrysis lutea</i>	Chromista, Haptophyta	NCBI:txid1321669	Huang <i>et al.</i> , 2019 [3]	marine water	x	x	x
<i>Acetabularia mediterranea</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid35845	Thompson, 1996 [105]	marine water		x	
<i>Asplenium viride</i>	Archaeplastida, Embryophyta	NCBI:txid147940	Künzler and Eichenberger, 1997 [102]	terrestrial		x	
<i>Bazzania yoshinagana</i>	Archaeplastida, Embryophyta	NCBI:txid989914	Sato and Furuya, 1985 [32]	terrestrial		x	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid3055	Eichenberger, 1982 [15]	freshwater		x	
<i>Chlorella kessleri</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid3074	Oishi <i>et al.</i> , 2022 [58]	freshwater		x	
<i>Chlorella minutissima</i>	Archaeplastida, Chlorophyta		Haigh <i>et al.</i> , 1996 [106]	freshwater		x	
<i>Chlorococcum amblystomatis</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid1008953	Conde <i>et al.</i> , 2021 [107]	freshwater		x	
<i>Cladophora japonica</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid162069	Sato and Furuya, 1985 [32]	marine, brackish and freshwater, terrestrial		x	
<i>Codium fragile</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid3133	Sato and Furuya, 1985 [32]	marine water		x	
<i>Coleochaete scutata</i>	Archaeplastida, Streptophyta	NCBI:txid3125	Sato and Furuya, 1985 [32]	freshwater		x	
<i>Dunaliella salina</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid3046	Norman and Thompson, 1985 [108]	marine and freshwater		x	
<i>Fritschiella tuberosa</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid56004	Eichenberger, 1982 [15]	freshwater		x	
<i>Lycopodium clavatum</i>	Archaeplastida, Embryophyta	NCBI:txid3252	Sato and Furuya, 1984 [18]	terrestrial		x	
<i>Lygodium japonicum</i>	Archaeplastida, Embryophyta	NCBI:txid13824	Sato and Furuya, 1984 [18]	terrestrial		x	
<i>Marchantia polymorpha</i>	Archaeplastida, Embryophyta	NCBI:txid3197	Lu <i>et al.</i> , 2023 [31]	terrestrial		x	
<i>Mastocarpus stellatus</i>	Archaeplastida, Rhodophyta	NCBI:txid29227	Künzler and Eichenberger, 1997 [102]	marine water		x	
<i>Micromonas pusilla</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid38833	Maat <i>et al.</i> , 2015 [109]	marine water	x	x	
<i>Ostreococcus tauri</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid70448	Degraeve-Guilbault <i>et al.</i> , 2017 [5]	marine water	x		
<i>Phyllophora pseudoceranoides</i>	Archaeplastida, Rhodophyta	NCBI:txid508189	Künzler and Eichenberger., 1997 [102]	marine water		x	
<i>Picochlorum atomus</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid133490	Cañavate <i>et al.</i> , 2016 [99]	marine water		x	
<i>Polytoma uvella</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid40532	Eichenberger, 1982 [15]	freshwater		x	
<i>Racomitrium lanuginosum</i>	Archaeplastida, Embryophyta	NCBI:txid140628	Lu <i>et al.</i> , 2023 [31]	terrestrial		x	
<i>Selaqinella kraussiana</i>	Archaeplastida, Embryophyta	NCBI:txid81964	Künzler and Eichenberger, 1997 [102]	terrestrial		x	
<i>Tetraselmis suecica</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid270643	Cañavate <i>et al.</i> , 2016 [99]	marine water	x		

Species name	Classification	Taxonomy ID	Reference	Habitat	DGTA	DGTS	DGCC
<i>Ulva lactuca</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid63410	Dembitsky and Rozentsvet, 1996 [92]	marine water		x	
<i>Ulva pertusa</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid3120	Sato and Furuya, 1985 [32]	marine water		x	
<i>Volvox carteri</i>	Archaeplastida, Chlorophyta	NCBI:txid3067	Moseley and Thompson, 1980 [110]	freshwater		x	
<i>Diplonema papillatum</i>	Euglenozoa	NCBI:txid91374	Škodová-Sveráková <i>et al.</i> , 2021 [111]	marine water	x		
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Amoebozoa	NCBI:txid5755	Furlong <i>et al.</i> , 1990 [112]	terrestrial			x
<i>Boletus edulis</i>	Fungi, Basidiomycota	NCBI:txid36056	Vaskovsky <i>et al.</i> , 1998 [113]	terrestrial			x
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Fungi, Basidiomycota	NCBI:txid5207	Lev <i>et al.</i> , 2019 [80]	terrestrial	x	x	
<i>Fusarium graminearum</i>	Fungi, Ascomycota	NCBI:txid5518	Zhang <i>et al.</i> , 2016 [81]	terrestrial			x
<i>Xylaria hypoxylon</i>	Fungi, Ascomycota	NCBI:txid37992	Künzler and Eichenberger, 1997 [102]	terrestrial			x
<i>Cereibacter sphaeroides</i> (or <i>Rhodobacter sphaeroides</i>)	Bacteria	NCBI:txid1063	Hofmann and Eichenberger, 1996 [74]/Benning <i>et al.</i> , 1995 [20]	marine and freshwater			x

Table 1 Representative distribution list of the three BL species among organisms, based on data from the literature. This work relies on the detection (x) of BL produced by TLC methods or mass spectrometry with the identification of specific fragments of DGTS and DGTA. Absence of an “x” means that the betaine lipid was not detected because either it is absent either it is below the detection level of the used technique. The colors blue, green, pink, yellow, light pink, and orange represent the general phylogenetic classification of the listed species, corresponding respectively to Chromista, green lineage organisms, Euglenozoa, Amoebozoa, fungi, and bacteria. The unique identifier for each species is provided by NCBI taxonomy.

2. BTA1 phylogeny

In the present review, we sought at identifying possible evolutionary pathways of betaine lipid-producing organisms by analyzing the amino acid sequences of the BTA1 protein. We began with sequences recently published by Bolik et al. (2023) [9]. We then compared this dataset with [Table 1](#) to fill the gaps. Most organisms listed in [Table 1](#) either lacked a sequenced genome or had an unidentifiable BTA1 gene. We utilized a bioinformatics approach to include the maximum number of species in our analysis (see [Supplementary Methods section 7.2](#)). This effort resulted in the addition of 25 sequences to the Bolik et al. (2023) dataset [9], often requiring us to work with non-annotated genomes or transcriptomes. Given the differing configurations of the BtaA- and BtaB-like domains, which correspond to the pfam DUF3419 and S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase domains, respectively, we aligned and analyzed each domain separately ([Figure 4](#)), as detailed in Bolik et al. (2023) [9].

In the final alignment, the sequence of the fern *Diphasiastum complanatum* was included due to its phylogenetic proximity to the fern *Lygodium japonicum*, despite no indication of its ability to produce betaine lipids. A similar rationale was used for the inclusion of the dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* sequence; although belonging to the order Suessiales, it can be hypothesized that it produces DGCC like *Prorocentrum micans*, which belongs to the order Prorocentrales. Notably, the sequences from *Acanthamoeba castellanii*, *Chara brunii*, *Haematococcus lacustris*, *Lygodium japonicum*, and *Symbiodinium microadriaticum* contained only the DUF3419 domain, similar to bacteria. In the *Lycopodium clavatum* genome, two genes bore a DUF3419 domain: one containing both the SAM and DUF3419 domains, and another bearing only the DUF3419 domain. After alignment and preliminary phylogenetic analyses, the sequence harboring only the DUF3419 domain was removed because it was too short and possibly represented a truncation or a pseudogene or a case of independent horizontal gene transfer.

Three main exceptions to the hypothesis proposed by Bolik et al. (2023) [9]—which suggests that marine species show a DUF3419-SAM configuration (type B) while freshwater and terrestrial species show the opposite arrangement (type A)—should be noted: 1) the freshwater diatoms *Alphora coffeiformis*, *Nitzschia inconspicua*, *Fragilaria crotonensis*, and *Mayamaea pseudoterrestris*; 2) the freshwater Chrysophyte *Ochromonas danica*; and 3) the marine unicellular Chlorophyte *Chloropicon primus*. The first two exceptions, although living in freshwater, show a marine arrangement of the domains. Notably, both belong to the SAR supergroup, suggesting that SARs may have evolved in marine environments and subsequently moved back to freshwater. Conversely, *Chloropicon primus*, although a marine species, shows a freshwater configuration.

The Bayesian phylogenetic inference ([Figure 4](#)) showed no correlation of the betaine lipid synthesized with the phylogenetic position of the BTA1 protein, indeed DGTA and DGTS producers can sit in the same clade, like the haptophytes *Diacronema lutheri* and *Emiliania huxleyi*. The present follow-up to Bolik et al (2023) [9] work gives insights about the inconsistency between the molecular evolution of genes and proteins and the corresponding metabolites. Nonetheless, our analyses highlight the wider metabolic diversity showed by unicellular algae compared to the green lineage with the latter producing mainly exclusively DGTS.

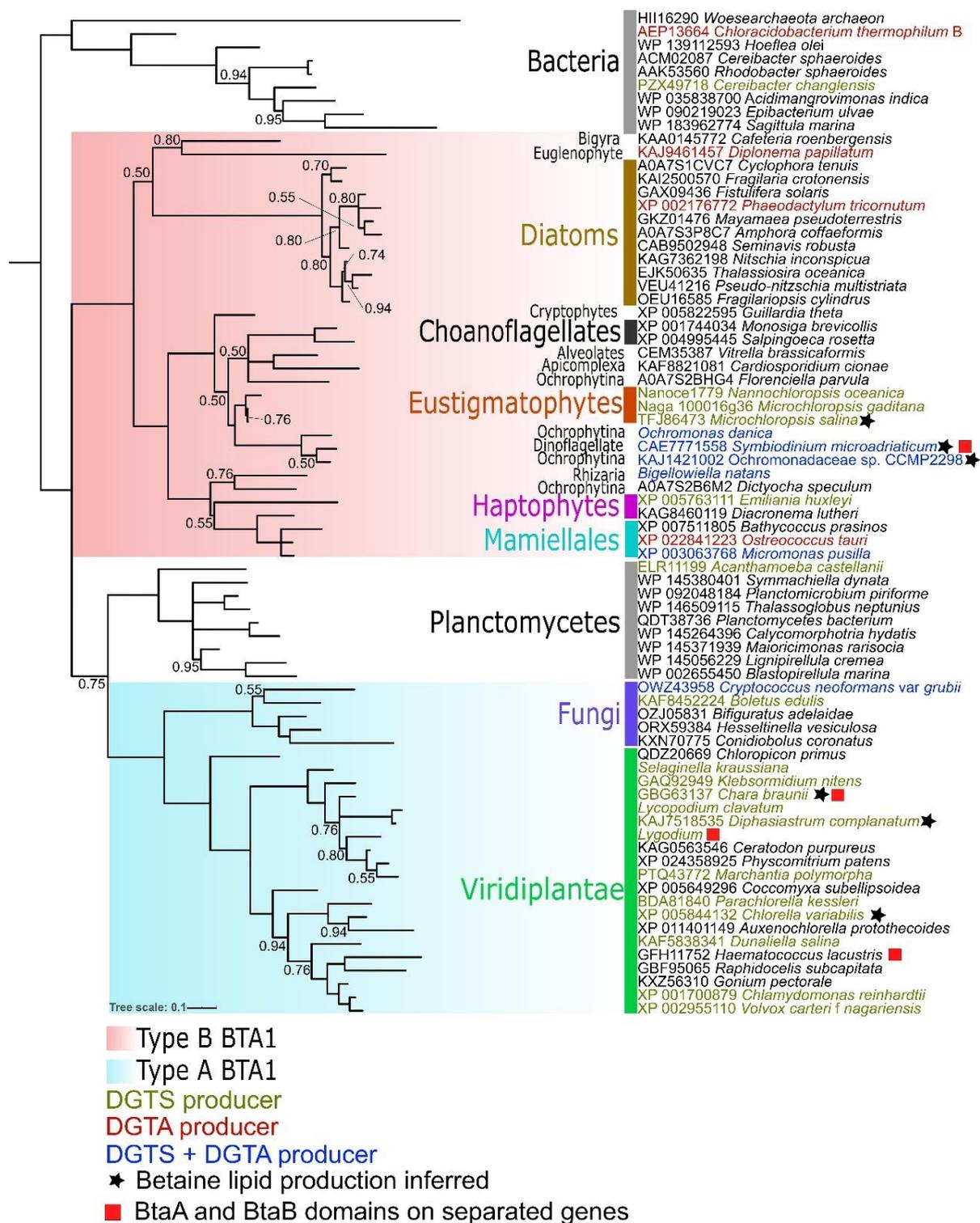


Figure 4: BTA1 protein Bayesian phylogenetic inference of the BtaA domain. Posterior Probability values below 0.95 are reported at each node. Type B BTA1 proteins are shaded in red, while type A BTA1 proteins are shaded in blue. Sequence accession numbers precede species names. Species indicated in green identify DGTS producers, in red DGTA producers and in blue DGTS and DGTA producers. A star indicates closely related species that synthesize the corresponding betaine lipids. A red rectangle denotes species where BtaA and BtaB domains are encoded on separate genes. The BtaA domain phylogeny was computed as described by Bolik et al., 2023 [9] using a partitioned model, one including the amino acid sequence and the others for the betaine lipid produced and the BTA1 type A or B. 4 million generations were imposed.

As previously stated, the hypothesis that DGTA derives from DGTS has recently gained strength. It is believed that decarboxylation/carboxylation reactions are fundamental to the conversion of DGTS into DGTA. However, this decarboxylation/carboxylation must occur extremely quickly, at least in *P. tricornutum* and other species that contain only DGTA, as no traces of DGTS have ever been identified in the lipidomes. This suggests that the enzyme/s involved in the conversion of DGTS to DGTA may be closely associated with BTA1. An alternative approach could involve a comprehensive *in silico* structural comparative analysis of the full BTA1 amino acid sequences from species that synthesize DGTS and phylogenetically related ones that synthesize DGTA. This could help identify potential domains responsible for interactions with other enzymes.

If the full-length sequence of the BTA1 enzyme could provide insights into the mechanism of DGTA production from DGTS, another phylogenetic analysis was conducted on the 33 type B BTA1 sequences, as illustrated in [Figure 5](#). In this analysis, the full-length sequences were aligned and curated then followed by a Bayesian phylogenetic analysis as detailed in the Supplementary Methods. Compared to the previous analysis, which was based on a reduced number of residues, this approach offered better statistical support for certain nodes. The latter analysis reveals representatives of the SAR 'supergroup' dispersed throughout the entire Bayesian phylogenetic tree. For instance, diatoms form a robust, self-standing clade, closely related to Bigyra (*Cafeteria roenbergensis*) and the euglenophyte *Diplonema papillatum*. Eustigmatophytes, such as *Nannochloropsis* and *Microchloropsis*, cluster with the cryptophyte *Guillardia theta* in a sister clade to choanoflagellates *Monosiga brevicollis* and *Salpingoeca rosetta*. The distant phylogenetic position of eustigmatophytes from other stramenopiles, particularly from diatoms, was previously noted for the phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) [114] and diacylglycerol acyltransferase (DGAT) [115] enzymes. It has been hypothesized that such discrepancies between taxonomic assignments and the phylogenetic positions of certain proteins may indicate different evolutionary histories in closely related taxa. In eustigmatophytes, the secondary host-originated gene may have been retained, whereas in other stramenopiles, the red algal gene was retained.

Regardless of the evolutionary pathway taken by the gene encoding the type B BTA1 protein, the organism's ability to synthesize either DGTS or DGTA did not follow the same route. Therefore, the enigma of the enzymes capable of converting DGTS into DGTA remains unresolved, requiring further experimental and computational investigations to explore this intriguing issue.

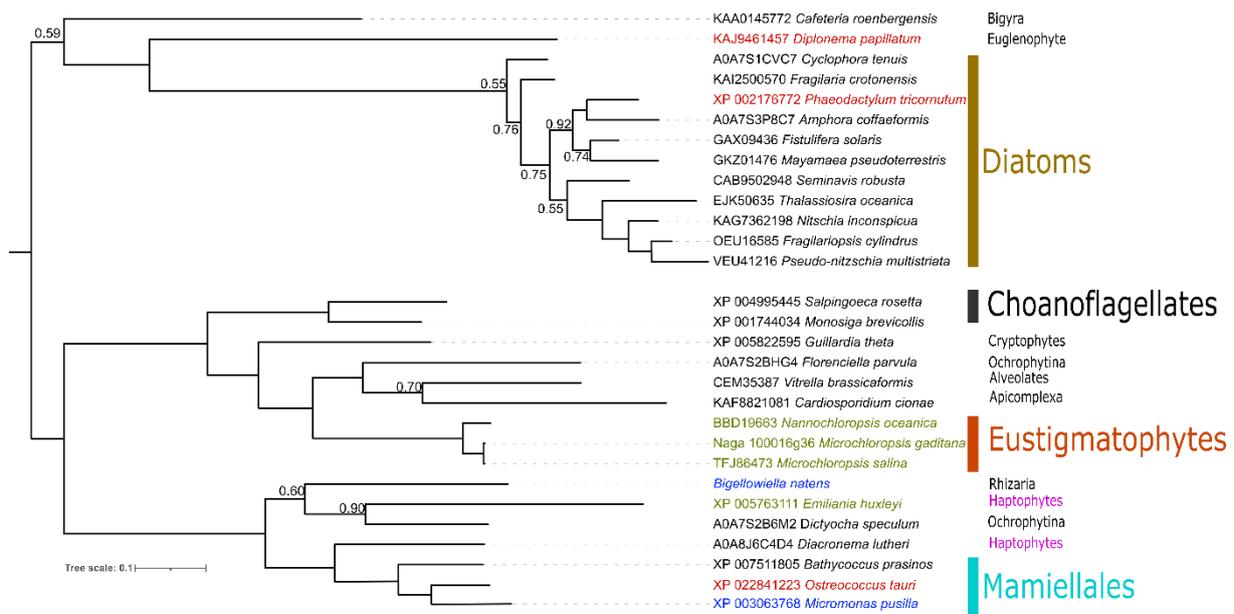


Figure 5: Bayesian phylogenetic inference of the full-length protein of the type B BTA1 only (shaded in red in Figure 4). Posterior Probability values below 0.95 are reported at each node. The phylogenetic analysis employed an alignment comprising 452 positions. The inference was performed using 8 Markoff chains (one cold and 7 heated) and 2 million generations. Color code follows Figure 5.

6. Concluding remarks

BL are non-phosphorus glycerolipids predominantly found in extraplastidial membranes of unicellular algae. In this review, a thorough literature survey was conducted to summarize the available knowledge on these poorly understood lipids. Discovered in the 1970s, betaine lipids have been identified in an increasing number of organisms since the development of mass spectrometry techniques. They have been detected in diverse unicellular eukaryotes – mainly microalgae – as well as certain bacteria, fungi, macroalgae and some bryophyte and pteridophyte. Among the three identified species, DGTS is the most widespread and extensively studied form. It is considered an ancestral glycerolipid to PC, progressively replaced by the latter during the evolution of the green lineage.

According to the literature, BL are regarded as substitute lipids for phospholipids, particularly under conditions of phosphorus deficiency. This mechanism has been extensively studied in numerous species, where the synthesis of betaine lipids increases concomitantly with the degradation of phospholipids in response to Pi deficiency. However, the relationship between BL and phospholipids appears to be more complex than a simple substitution. In some species, the synthesis of BL remains constant and independent of Pi levels in the environment, with phospholipids being intrinsically low in abundance. Several studies have highlighted the specific role of BL in the lipid metabolism. They are believed to participate in the redistribution of EPA among plastidial lipids via the omega pathway, although these hypotheses stem from indirect evidence. In marine algae, BL are primarily considered as final acceptors of VLC-PUFAs. They also seem to play a role in adaptation to cold temperatures and nitrogen deficiency, although these roles have been investigated in a very limited number of species. Indeed, most studies have been conducted in the green alga *C. reinhardtii* or certain stramenopile model species, primarily focused on DGTS or DGTA. Further investigations would be needed to better understand the specific roles of the three BL in organisms.

Regarding the biosynthesis of BL, all studies seem to indicate the essential role of the *BTA1* gene in the synthesis of DGTS as well as DGTA. While the biosynthetic pathway of DGTS is fully resolved, some uncertainties remain regarding DGTA synthesis. Nevertheless, recent findings in *P. tricornutum* represent a significant advance in elucidating the DGTA pathway; the *BTA1* gene is indeed involved in its synthesis by enabling the production of DGTS as an intermediate. Further analyses need to be conducted to identify genes involved in the conversion of DGTS to DGTA. The phylogenetic studies presented in this review do not seem to indicate a potential link between the evolution of the *BTA1* protein and the type of BL produced. However, they have confirmed previous findings [9] regarding the distribution of BL among organisms: while the green lineage predominantly contains DGTS, marine organisms exhibit greater diversity in the BL they produce, thereby supporting the hypothesis of BL diversification in the marine environment and the gradual disappearance of DGTS in the evolution of the green lineage.

7. Supplementary methods

7.1. *P.t bta1* KO mutants generation by CRISPR-Cas9 method

Single guide RNA (sgRNA) design was achieved using crispor.tefor website (<http://crispor.tefor.net/>) with the reference genome of *P. tricornutum*, choosing NGG as Protospacer Adjacent Motif (PAM) sequence, and allowing CRISPR targets to start with any nucleotide. The selected sgRNA 5'→3' sequence was GCAAGCCAAGGGTTACGACG, located between nucleotide 1407 and 1429 of the coding sequence of the gene. The sgRNA insert was obtained by annealing forward primer TCGAGCAAGCCAAGGGTTACGACG and reverse primer AAACCGTCGTAACCCTTGGCTTGC, generating cohesive ends for subsequent ligation with the episome PtPuc3_diaCas9_sgRNA acquired from addgene (Plasmid #109219). To generate the sgRNA insert, 2.5 µL of each primer at 100 µM were mixed with 45 µL of annealing buffer (1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.6) for a final concentration of 5 µM, then heated at 95°C for 4 minutes, and cooled down at room temperature for 45 minutes for hybridization. The episome PtPuc3_diaCas9_sgRNA was digested by BsaI enzyme, generating linearized vector with cohesive ends complementary to the prepared insert. 1 µL of prepared sgRNA insert and 100 ng of linearized vector were ligated using T4 DNA ligase (New England BioLabs). The ligation product was transformed into *E. coli* NEB5α (NEB 5-alpha Competent *E. coli*, New England BioLabs) for vector multiplication. Transformed bacteria were screened for the insertion of the sgRNA into the vector via PCR.

For bacterial conjugation, *P. tricornutum* culture at 5.10^8 cellules/mL was spread onto conjugation-based solid agar medium (45% ESAW, 1% agar, 5% LB) within 6-well cell culture plates. The plates were then incubated overnight at 20°C under constant light. Transformations were conducted via bacterial conjugation, involving the transfer of the episome PtPuc3_diaCas9_sgRNA from conjugation-competent bacteria to *P. tricornutum*. The conjugation-competent bacteria used were *E. coli* EPI300, which are designed for conjugal transfer of plasmids [116]. *E. coli* EPI300 were transformed with the generated PtPuc3_diaCas9_sgRNA episome carrying the sgRNA and selected on agar plates. The day prior to transformation, several random colonies from the selection plates were used to inoculate 3 mL of LB containing suitable antibiotics. Following overnight incubation, the preculture was used to initiate a culture with an optical density OD-600 nm of 0.1 in 12.5 mL of LB and appropriate antibiotics. After 3–4 hours of growth until reaching an OD-600 nm of 0.8–1, the culture was centrifuged at 3000 *xg* for 15 minutes to pellet the cells. The pellet was then gently resuspended in 100 µL of SOC media using a vortex. The *E. coli* suspension was then pipetted into the wells containing *P. tricornutum*. Wells were placed in darkness at 30°C for 90 minutes and subsequently returned to 20°C and exposed to

continuous light for 48 hours. Following incubation, each well was scraped with ESAW medium to collect the cells in a 2 mL Eppendorf tube, and then re-plated onto selection plates containing suitable selective media. The plates were then allowed to grow for 10–14 days or until colonies were visible.

Colony PCR (utilizing Phire Plant Direct PCR Master Mix, F160, ThermoFisher Scientific) was conducted to analyze the mutation profile through sequencing (Macrogen). Forward primer GATACCGGATTTTCACACGC and reverse primer TGCGAGACATTAGTATGCGC were designed to amplify a region approximately 1000 nucleotides surrounding the Cas9 protein's cleavage site.

For the assessment of mutant colonies, ICE (Inference of CRISPR Edits v2) online software was utilized to analyze the composition of the mutation profile. Mosaic colonies were spread onto plates supplemented with Carbenicillin and Zeocin. Following one to two weeks, the same steps of PCR and sequencing were conducted. The pure mutant colony displayed a 1-nucleotide deletion in the sgRNA sequence (GCAAGCCAAGGGTTACACG), generating a stop codon at 40 nucleotides after the deletion and a truncated protein of 487 amino acids instead of 715 amino acids.

7.2. Phylogeny

For species with annotated genomes or transcriptomes, we performed a BLAST search using the sequence of the *Ostreococcus tauri* BTA1 protein, selecting and downloading proteins with over 70% identity and a p-value below 0.05 (Supplementary File 1). Using these high-identity proteins, we created a local BLAST database and performed another BLAST search. We verified the presence of the BTA1 domain in each BLAST match using InterProScan [117]. For species without annotated genomes or transcriptomes, we created a FASTA file with all identified BTA1 protein sequences and aligned them against the non-annotated genomes using Exonerate (<https://www.ebi.ac.uk/about/vertebrate-genomics/software/exonerate>) with a protein-to-genome model. For each Exonerate match, we created a FASTA file containing the region's sequence similar to the BTA1 proteins. We then used MAKER [118] to annotate the extracted regions, using the retrieved protein and transcript sequences as local databases for MAKER. We confirmed the presence of the BTA1 domain in each protein identified by MAKER using InterProScan. Finally, we repeated the last steps, including all retrieved BTA1 proteins in the initial FASTA file. Once all the protein sequences were collected, InterProScan was used to identify the boundaries of the DUF3149 and the S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase (SAM) domains, corresponding to the BtaA and BtaB domains, respectively.

Author Contribution

SS wrote the original draft. SS and MM realize the plant and algae analysis. AA and OB performed the phylogeny analysis. All authors edited the manuscript. JJ supervised the research and the writing.

Funding Sources

Sarah Salomon was supported by an INRAE PhD fellowship. Juliette Jouhet was supported by the Blink ANR (ANR-18-CE92-0015). All authors are supported by GRAL, financed within the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

References

- [1] Van Mooy BAS, Fredricks HF, Pedler BE, Dyhrman ST, Karl DM, Koblížek M, et al. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* 2009;458:69–72. <https://doi.org/10.1038/nature07659>.
- [2] Abida H, Dolch LJ, Meř C, Villanova V, Conte M, Block MA, et al. Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 2015;167:118–36. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252395>.
- [3] Huang B, Marchand J, Thiriet-Rupert S, Carrier G, Saint-Jean B, Lukomska E, et al. Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta). *Algal Res* 2019;40. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101506>.
- [4] Cañavate JP, Armada I, Hachero-Cruzado I. Interspecific variability in phosphorus-induced lipid remodelling among marine eukaryotic phytoplankton. *New Phytol* 2017;213:700–13. <https://doi.org/10.1111/nph.14179>.
- [5] Degraeve-Guilbault C, Bréhélin C, Haslam R, Sayanova O, Marie-Luce G, Jouhet J, et al. Glycerolipid characterization and nutrient deprivation-associated changes in the green picoalga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol* 2017;173:2060–80. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01467>.
- [6] Fan J, Andre C, Xu C. A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 2011;585:1985–91. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018>.
- [7] Ferrer-Ledo N, Stegemüller L, Janssen M, Wijffels RH, Barbosa MJ. Growth and fatty acid distribution over lipid classes in *Nannochloropsis oceanica* acclimated to different temperatures. *Front Plant Sci* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1078998>.
- [8] Murakami H, Nobusawa T, Hori K, Shimojima M, Ohta H. Betaine lipid is crucial for adapting to low temperature and phosphate deficiency in *nannochloropsis*. *Plant Physiol* 2018;177:181–93. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01573>.
- [9] Bolik S, Schlaich A, Mukhina T, Amato A, Bastien O, Schnecke E, et al. Lipid bilayer properties potentially contributed to the evolutionary disappearance of betaine lipids in seed plants. *BMC Biol* 2023;21:1–16. <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01775-z>.
- [10] Cannell N, Emms DM, Hetherington AJ, MacKay J, Kelly S, Dolan L, et al. Multiple Metabolic Innovations and Losses Are Associated with Major Transitions in Land Plant Evolution. *Curr Biol* 2020;30:1783-1800.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.086>.
- [11] Dembitsky VM. Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology. *Prog Lipid Res* 1996;35:1–51. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(95\)00009-7](https://doi.org/10.1016/0163-7827(95)00009-7).
- [12] Nichols BW, Appleby RS. THE DISTRIBUTION AND BIOSYNTHESIS OF ARACHIDONIC ACID IN ALGAE. *Phytochemistry* 1969;8:1907–15.
- [13] Brown A, Elovson J. Isolation and characterization of a novel lipid, 1(3),2-diacylglyceryl-(3)-O-4'-(N,N,N-trimethyl)homoserine, from *Ochromonas danica*. *Biochemistry* 1974;34:76–82.
- [14] Vogel G, Woznica M, Gfeller H, Müller C, Stämpfli AA, Jenny TA, et al. 1(3),2-Diacylglyceryl-3(1)-O-2'-(hydroxymethyl)(N,N,N,-trimethyl)-β-alanine (DGTA): A novel betaine lipid from *Ochromonas danica* (Chrysophyceae). *Chem Phys Lipids* 1990;52:99–109. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(90\)90154-J](https://doi.org/10.1016/0009-3084(90)90154-J).
- [15] Eichenberger W. Distribution of diacylglyceryl-O-4'-N,N,N-trimethyl)-homoserine in different algae. *Plant Sci Lett* 1982;24:91–5.
- [16] Eichenberger W, Boschetti A. Occurrence of 1(3),2-diacylglyceryl-(3)-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 1978;88:201–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80173-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80173-2).
- [17] Evans RW, Kates M, Wood GW. Identification of diacylglycerol-O-(N,N,N-trimethyl)-homoserine in the halotolerant alga, *Dunaliella parva*. *Chem Phys Lipids* 1982;31:331–8. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(82\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0009-3084(82)90069-X).

- [18] Sato N, Furuya M. Distribution of diacylglyceryltrimethylhomoserine in selected species of vascular plants. *Phytochemistry* 1984;23:1625–7. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83454-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83454-8).
- [19] Dembitsky V, Rezanka T. Distribution of diacylglycerylhomoserines, phospholipids and fatty acids in thirteen moss species from Southwestern Siberia. *Biochem Syst Ecol* 1995;23:71–8.
- [20] Benning C, Huang Z-H, A. Cage D. Accumulation of a Novel Glycolipid and a Betaine Lipid in Cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under Phosphate limitation. *Arch Biochem Biophys* 1995;317:103–11.
- [21] Yamada T, Nozawa Y. An Unusual lipid in the human pathogenic fungus *Epidermophyton floccosum*. *Biochim Biophys Acta* 1979;574:433–9.
- [22] Araki S, Eichenberger W, Sakurai T, Sato N. Distribution of Diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl- β -alanine (DGTA) and Phosphatidylcholine in Brown Algae. *Plant Cell Physiol* 1991;32:623–8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078124>.
- [23] Kato M, Adachi K. A Betaine Lipid from *Pavlova lutheri*. *Phytochemistry* 1994;37:279–80.
- [24] Kato M, Sakai M, Adachi K, Ikemoto H, Sano H. Distribution of betaine lipids in marine algae. *Phytochemistry* 1996;42:1341–5. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00115-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00115-X).
- [25] Kharbush JJ. Intact polar diacylglycerol biomarker lipids isolated from suspended particulate organic matter accumulating in an ultraoligotrophic water column. *Org Geochem* 2016;13.
- [26] Vogel G, Eichenberger W. Betaine Lipids in Lower Plants. Biosynthesis of DGTS and DGTA in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) and the Possible Role of DGTS in Lipid Metabolism. vol. 33. 1992.
- [27] Jones AL, Harwood JL. Lipid composition of the brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 1992;31:3397–403.
- [28] Sato N. Betaine Lipids. *Bot Mag Tokyo* 1992;105:185–97.
- [29] Eichenberger W, Araki S, Müller DG. Betaine lipids and phospholipids in brown algae. *Phytochemistry* 1993;34:1323–33. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)80024-U](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80024-U).
- [30] Künzler K, Eichenberger W, Adunzb AR. Intracellular Localization of Two Betaine Lipids by Cell Fractionation and Immunomicroscopy. vol. 52. 1997.
- [31] Lu Y, Eiriksson FF, Thorsteinsdóttir M, Cronberg N, Simonsen HT. Lipidomes of Icelandic bryophytes and screening of high contents of polyunsaturated fatty acids by using lipidomics approach. *Phytochemistry* 2023;206. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113560>.
- [32] Sato N, Furuya M. Distribution of diacylglyceryltrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in non-vascular green plants. *Plant Sci* 1985;38:81–5.
- [33] Kato M, Hajiro-Nakanishi K, Sano H, Miyachi S. Polyunsaturated Fatty Acids and Betaine lipids from *Pavlova lutheri*. vol. 36. 1995.
- [34] Schlapfer P, Eichenberger W. Evidence for the involvement of diacylglyceryl (N,N,N-trimethyl) homoserine in the desaturation of oleic and linoleic acids in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Plant Sci Lett* 1983;32:243–52.
- [35] Giroud C, Eichenberger W. Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Incorporation of [14 C]acetate, [14 C]palmitate and [14 C]oleate into different lipids and evidence for lipid-linked desaturation of fatty acids. *Plant Cell Physiol* 1989;30:121–8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077705>.
- [36] Yang M, Meng Y, Chu Y, Fan Y, Cao X, Xue S, et al. Triacylglycerol accumulates exclusively outside the chloroplast in short-term nitrogen-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2018;1863:1478–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.09.009>.
- [37] Riekhof WR, Naik S, Bertrand H, Benning C, Voelker DR. Phosphate starvation in fungi induces the replacement of phosphatidylcholine with the phosphorus-free betaine lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine. *Eukaryot Cell* 2014;13:749–57. <https://doi.org/10.1128/EC.00004-14>.

- [38] Giroud C, Gerber A, Eichenberger W. Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of Molecular Species and Intracellular Site(s) of Biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 1988;29:587–95. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077533>.
- [39] Widzowski J, Vogel A, Altrogge L, Pfaff J, Schoof H, Usadel B, et al. High light induces species specific changes in the membrane lipid composition of *Chlorella*. *Biochem J* 2020;477:2543–59. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200160>.
- [40] Hoffmann DY, Shachar-Hill Y. Do betaine lipids replace phosphatidylcholine as fatty acid editing hubs in microalgae? *Front Plant Sci* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1077347>.
- [41] Young DY, Shachar-Hill Y. Large fluxes of fatty acids from membranes to triacylglycerol and back during N-deprivation and recovery in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 2021;185:796–814. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa071>.
- [42] Ohlrogge J, Browse J. Lipid Biosynthesis. *Plant Cell* 1995;7:27–65. <https://doi.org/10.1002/9781119991311.ch2>.
- [43] Eichenberger W, Gribi C. Lipids of *Pavlova lutheri*: Cellular site and metabolic role of DGCC. *Phytochemistry* 1997;45:1561–7. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00201-X).
- [44] Hofmann M, Eichenberger W. Radiolabelling Studies on the Lipid Metabolism in the Marine Brown Alga *Dictyoptera membranacea*. vol. 39. 1998.
- [45] Billey E, Magneschi L, Leterme S, Bedhomme M, Andres-Robin A, Poulet L, et al. Characterization of the Bubblegum acyl-CoA synthetase of *Microchloropsis gaditana*. *Plant Physiol* 2021;185:815–35. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAA110>.
- [46] Smith R, Jouhet J, Gandini C, Nekrasov V, Marechal E, Napier JA, et al. Plastidial acyl carrier protein $\Delta 9$ -desaturase modulates eicosapentaenoic acid biosynthesis and triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant J* 2021;106:1247–59. <https://doi.org/10.1111/tpj.15231>.
- [47] Sato N. Lipids in *Cryptomonas CR-1*. II. Biosynthesis of Betaine Lipids and Galactolipids. vol. 32. 1991.
- [48] Makewicz A, Gribi C, Eichenberger W. Lipids of *Ectocarpus fasciculatus* (Phaeophyceae). Incorporation of [^{14}C]Oleate and the Role of TAG and MGDG in Lipid Metabolism. vol. 38. 1997.
- [49] Banskota AH, Stefanova R, Sperker S, McGinn PJ. New diacylglyceryltrimethylhomoserines from the marine microalga *Nannochloropsis granulata* and their nitric oxide inhibitory activity. *J Appl Phycol* 2013;25:1513–21. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9967-1>.
- [50] Li S, Xu J, Chen J, Chen J, Zhou C, Yan X. The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. *Aquaculture* 2014;428–429:104–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.032>.
- [51] Pal D, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Solovchenko A, Batushansky A, Kaye Y, et al. Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* CICALA 804 in response to osmotic downshift. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:8291–306. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5092-6>.
- [52] Huang. Nitrogen and phosphorus limitations induce carbon partitioning and membrane lipid remodelling in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Eur J Phycol* 2019;54:342–58. <https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1567823>.
- [53] Meng Y, Cao X, Yang M, Liu J, Yao C, Xue S. Glycerolipid remodeling triggered by phosphorous starvation and recovery in *Nannochloropsis oceanica*. *Algal Res* 2019;39. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101451>.
- [54] Mühlroth A, Winge P, El Assimi A, Jouhet J, Maréchal E, Hohmann-Marriott MF, et al. Mechanisms of phosphorus acquisition and lipid class remodeling under P limitation in a marine microalga. *Plant Physiol* 2017;175:1543–59. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00621>.
- [55] López-Lara IM, Gao JL, Soto MJ, Solares-Pérez A, Weissenmayer B, Sohlenkamp C, et al. Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. *Mol Plant Microbe Interact* 2005;18:973–82. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0973>.

- [56] Lu N, Wei D, Chen F, Yang ST. Lipidomic profiling reveals lipid regulation in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* in response to nitrate or phosphate deprivation. *Process Biochem* 2013;48:605–13. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.028>.
- [57] Khozin-Goldberg I, Cohen Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 2006;67:696–701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>.
- [58] Oishi Y, Otaki R, Iijima Y, Kumagai E, Aoki M, Tsuzuki M, et al. Diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine-dependent lipid remodeling in a green alga, *Chlorella kessleri*. *Commun Biol* 2022;5. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02927-z>.
- [59] Shemi A, Schatz D, Fredricks HF, Van Mooy BAS, Porat Z, Vardi A. Phosphorus starvation induces membrane remodeling and recycling in *Emiliania huxleyi*. *New Phytol* 2016;211:886–98. <https://doi.org/10.1111/nph.13940>.
- [60] Cañavate JP, Armada I, Hachero-Cruzado I. Aspects of phosphorus physiology associated with phosphate-induced polar lipid remodeling in marine microalgae. *J Plant Physiol* 2017;214:28–38. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.03.019>.
- [61] Simionato D, Block MA, La Rocca N, Jouhet J, Maréchal E, Finazzi G, et al. The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryot Cell* 2013;12:665–76. <https://doi.org/10.1128/EC.00363-12>.
- [62] Popko J, Herrfurth C, Feussner K, Ischebeck T, Iven T, Haslam R, et al. Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE* 2016;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164673>.
- [63] Lee JW, Shin SY, Kim HS, Jin ES, Lee HG, Oh HM. Lipid turnover between membrane lipids and neutral lipids via inhibition of diacylglycerol N,N,N-trimethylhomoserine synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res* 2017;27:162–9. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.001>.
- [64] Xu C, Andre C, Fan J, Shanklin J. Cellular Organization of Triacylglycerol Biosynthesis in Microalgae. *Lipids Plant Algae Dev* 2016;86:207–21.
- [65] Yang D, Song D, Kind T, Ma Y, Hoefkens J, Fiehn O. Lipidomic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen and sulfur deprivation. *PLoS ONE* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137948>.
- [66] Yang M, Kong F, Xie X, Wu P, Chu Y, Cao X, et al. Galactolipid dgdg and betaine lipid dgts direct de novo synthesized linolenate into triacylglycerol in a stress-induced starchless mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 2020;61:851–62. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa012>.
- [67] Young DY, Pang N, Shachar-Hill Y. ¹³C-labeling reveals how membrane lipid components contribute to triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 2022;189:1326–44. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac154>.
- [68] Lynch D V., Thompson GA. Low Temperature-Induced Alterations in the Chloroplast and Microsomal Membranes of *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 1982;69:1369–75. <https://doi.org/10.1104/pp.69.6.1369>.
- [69] Murata N, Los DA. Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol* 1997;115:875–9. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.875>.
- [70] Tatsuzawa H, Takizawa E. Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*. *Phytochemistry* 1995;40:397–400. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00327-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00327-4).
- [71] Sato N. Dual Role of Methionine in the Biosynthesis of Diacylglycerol-trimethylhomoserine in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1988;86:931–4. <https://doi.org/10.1104/pp.86.3.931>.

- [72] Sato N, Kato K. Analysis and biosynthesis of diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in the cells of *Marchantia* in suspension culture. *Plant Sci* 1988;55:21–5. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(88\)90037-4](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90037-4).
- [73] Sato N, Murata N. Transition of lipid phase in aqueous dispersions of diacylglyceryltrimethylhomoserine. *Biochim Biophys Acta* 1991;108–11.
- [74] Hofmann M, Eichenberger W. Biosynthesis of Diacylglyceryl-N,N,N-Trimethylhomoserine in *Rhodobacter sphaeroides* and Evidence for Lipid-Linked N Methylation. vol. 178. 1996.
- [75] Moore TS, Du Z, Chen Z. Membrane Lipid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. In *Vitro Biosynthesis of Diacylglyceryltrimethylhomoserine*. *Plant Physiol* 2001;125:423–9.
- [76] Klug RM, Benning C. Two enzymes of diacylglyceryl-O-4'-(N,N,N,-trimethyl)-homoserine biosynthesis are encoded by *btaA* and *btaB* in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5910–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.101037998>.
- [77] Riekhof WR, Andre C, Benning C. Two enzymes, *BtaA* and *BtaB*, are sufficient for betaine lipid biosynthesis in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 2005;441:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.07.001>.
- [78] Riekhof WR, Sears BB, Benning C. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the betaine lipid synthase *BTA1Cr*. *Eukaryot Cell* 2005;4:242–52. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.242-252.2005>.
- [79] Senik S V., Maloshenok LG, Kotlova ER, Shavarda AL, Moiseenko K V., Bruskin SA, et al. Diacylglyceryltrimethylhomoserine content and gene expression changes triggered by phosphate deprivation in the mycelium of the basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry* 2015;117:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.021>.
- [80] Lev S, Rupasinghe T, Desmarini D, Kaufman-Francis K, Sorrell TC, Roessner U, et al. The PHO signaling pathway directs lipid remodeling in *Cryptococcus neoformans* via DGTS synthase to recycle phosphate during phosphate deficiency. *PLoS ONE* 2019;14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212651>.
- [81] Zhang Y, He J, Jia LJ, Yuan TL, Zhang D, Guo Y, et al. Cellular Tracking and Gene Profiling of *Fusarium graminearum* during Maize Stalk Rot Disease Development Elucidates Its Strategies in Confronting Phosphorus Limitation in the Host Apoplast. *PLoS Pathog* 2016;12:1–33. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005485>.
- [82] Li-Beisson Y, Beisson F, Riekhof W. Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 2015;82:504–22. <https://doi.org/10.1111/tpj.12787>.
- [83] Vogel G, Woznica M, Gfeller H, Mtiller C, Stimpfli AA, Jenny TA, et al. (3), 2-Diacylglyceryl-3 (1)-O-2'-(hydroxymethyl)(N,N,N-tri-methyl)-/3-alanine (DGTA): A novel betaine lipid from *Ochromonas danica* (Chrysophyceae)*. vol. 52. 1990.
- [84] Meireles LA, Guedes AC, Malcata FX. Lipid class composition of the microalga *Pavlova lutheri*: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *J Agric Food Chem* 2003;51:2237–41. <https://doi.org/10.1021/jf025952y>.
- [85] Cruz de Carvalho MH, Sun HX, Bowler C, Chua NH. Noncoding and coding transcriptome responses of a marine diatom to phosphate fluctuations. *New Phytol* 2016;210:497–510. <https://doi.org/10.1111/nph.13787>.
- [86] Salomon S, Schilling M, Albrieux C, Larbi GS, Jouneau P, Roy S. DGTS overproduced in seed plants is excluded from plastid membranes and promotes endomembrane expansion 2024. <https://doi.org/10.1101/2024.07.11.603045>.
- [87] Roche SA, Leblond JD. Betaine lipids in chlorarachniophytes. *Phycol Res* 2010;58:298–305. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2010.00590.x>.
- [88] Canãvate JP, Armada I, Riós JL, Hachero-Cruzado I. Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* 2016;124:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.02.007>.
- [89] Li Y, Lou Y, Mu T, Xu J, Zhou C, Yan X. Simultaneous structural identification of diacylglyceryl-N-trimethylhomoserine (DGTS) and diacylglycerylhydroxymethyl-N,N,N-trimethyl-β-alanine (DGTA) in microalgae using dual Li⁺/H⁺ adduct ion mode by ultra-performance liquid

- chromatography/quadrupole ti. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2017;31:457–68. <https://doi.org/10.1002/rcm.7818>.
- [90] Armada I, Hachero-Cruzado I, Mazuelos N, Ríos JL, Manchado M, Cañavate JP. Differences in betaine lipids and fatty acids between *Pseudoisochrysis paradoxa* VLP and *Diacronema vlkianum* VLP isolates (Haptophyta). *Phytochemistry* 2013;95:224–33. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.024>.
- [91] Dembitsky VM. Lipids of bryophytes. *Prog Lipid Res* 1993;32:281–356. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(93\)90010-T](https://doi.org/10.1016/0163-7827(93)90010-T).
- [92] Dembitsky VM, Rozentsvet OA. Distribution of polar lipids in some marine, brackish and freshwater green macrophytes. *Phytochemistry* 1996;41:483–8. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00570-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00570-6).
- [93] Oliver MJ, Tuba Z, Mishler BD. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. vol. 151. 2000.
- [94] Guschina IA, Harwood JL, Smith M, Beckett RP. Abscisic acid modifies the changes in lipids brought about by water stress in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytol* 2002;156:255–64. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00517.x>.
- [95] Rozenstvet OA. Comparative examination of distribution of phospholipids and a betaine lipid DGTS in tropical fern species. *Biochem Syst Ecol* 2004;32:303–11. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.07.003>.
- [96] Rozenstvet OA, Saksonov S V., Filin VR, Dembitsky VM. Seasonal changes of lipid content in the leaves of some ferns. *Physiol Plant* 2001;113:59–63. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130108.x>.
- [97] Jones AL, Harwood JL. Lipid composition of the brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 1992;31:3397–403. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83693-S](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83693-S).
- [98] Sato N, Nemoto Y, Furuya M. Lipids of *Chattonella Antiqua* (Raphidophyceae). In: Stumpf PK, Mudd JB, Nes WD, editors. *Metab. Struct. Funct. Plant Lipids*, Boston, MA: Springer New York; 1987, p. 661–3. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5263-1_118.
- [99] Cañavate JP, Armada I, Ríos JL, Hachero-Cruzado I. Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* 2016;124:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.02.007>.
- [100] Eichenberger W, Gfeller H, Grey P, Gribi C, James Henderson R. Gas chromatographic-mass spectrometric identification of betaine lipids in *Chroomonas salina*. *Phytochemistry* 1996;42:967–72. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00055-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00055-6).
- [101] Li Y, Ye M, Zhang R, Xu J, Zhou C, Yan X. Lipid compositions in diatom *Conticribra weissflogii* under static and aerated culture conditions. *Phycol Res* 2016;64:281–90. <https://doi.org/10.1111/pre.12144>.
- [102] Künzler K, Eichenberger W. Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi. *Phytochemistry* 1997;46:883–92. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)81274-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)81274-5).
- [103] Martin P, Van Mooy BA, Heithoff A, Dyhrman ST. Phosphorus supply drives rapid turnover of membrane phospholipids in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *ISME J* 2011;5:1057–60. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.192>.
- [104] Hunter JE, Brandsma J, Dymond MK, Koster G, Moore CM, Postle AD, et al. Lipidomics of *Thalassiosira pseudonana* under Phosphorus Stress Reveal Underlying Phospholipid Substitution Dynamics and Novel Diglycosylceramide Substitutes. *Appl Environ Microbiol* 2018;84:e02034-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02034-17>.
- [105] Thompson GA. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab* 1996;1302:17–45. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00045-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00045-8).
- [106] Haigh WG, Yoder TF, Ericson L, Pratum T, Winget RR. The characterisation and cyclic production of a highly unsaturated homoserine lipid in *Chlorella minutissima*. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab* 1996;1299:183–90. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00205-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00205-7).

- [107] Conde TA, Neves BF, Couto D, Melo T, Neves B, Costa M, et al. Microalgae as Sustainable Bio-Factories of Healthy Lipids: Evaluating Fatty Acid Content and Antioxidant Activity. *Mar Drugs* 2021;19:357. <https://doi.org/10.3390/md19070357>.
- [108] Norman HA, Thompson GA. Quantitative analysis of *Dunaliella salina* diacylglyceryltrimethylhomoserine and its individual molecular species by high performance liquid chromatography. *Plant Sci* 1985;42:83–7. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90146-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90146-3).
- [109] Maat DS, Bale NJ, Hopmans EC, Sinninghe Damsté JS, Schouten S, Brussaard CPD. Increasing P limitation and viral infection impact lipid remodeling of the picophytoplankter *Micromonas pusilla*. *Biogeosciences* 2016;13:1667–76. <https://doi.org/10.5194/bg-13-1667-2016>.
- [110] Moseley KR, Thompson GA Jr. Lipid Composition and Metabolism of *Volvox carteri* 1. *Plant Physiol* 1980;65:260–5. <https://doi.org/10.1104/pp.65.2.260>.
- [111] Škodová-Sveráková I, Záhonová K, Juricová V, Danchenko M, Moos M, Baráth P, et al. Highly flexible metabolism of the marine euglenozoan protist *Diplonema papillatum*. *BMC Biol* 2021;19:1–21. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01186-y>.
- [112] Furlong ST, Leary JA, Costello CE, Dawidowicz EA. Isolation and identification of 1(3),2-diacylglyceryl-(3)-O-4'-(N,N,N-trimethyl)homoserine from the soil amoeba, *Acanthamoeba castellanii*. *J Lipid Res* 1990;27:1182–9. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38754-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38754-X).
- [113] Vaskovsky VE, Khotimchenko SV, Boolugh EM. Distribution of diacylglyceroltrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in mushrooms. *Phytochemistry* 1998;47:755–60. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00624-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00624-9).
- [114] Yang J, Liu J, Pan Y, Maréchal E, Amato A, Liu M, et al. PDAT regulates PE as transient carbon sink alternative to triacylglycerol in *Nannochloropsis*. *Plant Physiol* 2022;189:1345–62. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac160>.
- [115] Wang D, Ning K, Li J, Hu J, Han D, Wang H, et al. *Nannochloropsis* Genomes Reveal Evolution of Microalgal Oleaginous Traits. *PLoS Genet* 2014;10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004094>.
- [116] Karas BJ, Diner RE, Lefebvre SC, McQuaid J, Phillips APR, Noddings CM, et al. Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. *Nat Commun* 2015;6:1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms7925>.
- [117] Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, et al. InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 2014;30:1236–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>.
- [118] Holt C, Yandell M. MAKER2: An annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects. *BMC Bioinformatics* 2011;12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-491>.

Résultats

Chapitre 1 : Etude de la production du DGTS chez les plantes supérieures

1. Préambule

Le premier axe de ce projet de thèse vise à étudier l'impact de la production du DGTS chez les plantes supérieures. Comme expliqué précédemment, le DGTS est un BL fortement représenté chez les algues de la lignée verte dont sont issues les plantes terrestres. Au cours de l'évolution, la synthèse du DGTS chez ces organismes a progressivement diminué pour être remplacée par la synthèse de PC. Bien que de petites quantités de DGTS soient toujours produites chez certaines bryophytes et ptéridophytes, la synthèse du DGTS a été définitivement perdue lors de l'émergence des plantes à graines (Cannell et al., 2020). Chez ces dernières, le gène *BTA1* est absent et la PC représente le phospholipide majoritaire des membranes extraplastidiales (**Figure 15**).

Chez les microalgues, les BL sont considérés comme d'excellents substituts aux phospholipides. Ils sont localisés dans les membranes extraplastidiales et leur synthèse est augmentée en réponse à la carence de Pi pour pallier la dégradation des phospholipides. Ce remodelage lipidique est particulièrement efficace chez certaines espèces marines telles que *N. oceanica* car le DGTS peut remplacer l'intégralité des phospholipides dégradés au sein des membranes (Mühlroth et al., 2017). Chez les plantes à graines, le remodelage lipidique déclenché en carence de Pi est différent et fait intervenir une autre classe de glycérolipide. En effet, les phospholipides dégradés sont remplacés par le DGDG dont la synthèse est fortement stimulée. Ce dernier est transféré du plaste vers les autres organelles comme la mitochondrie (Jouhet et al., 2004). Ce mécanisme d'adaptation permet de remplacer seulement une portion de la PC et de la PE présentes dans les membranes, limitant ainsi leur dégradation et le recyclage du Pi qui en découle. Plusieurs études ont montré que les caractéristiques biophysiques des membranes s'expliquaient par leur composition lipidique. Le DGDG rendrait les membranes plus rigides et favoriserait leur empilement contrairement à des membranes constituées de PC, justifiant ainsi la présence importante de DGDG dans le chloroplaste (Kanduc et al., 2017). Le remplacement de la PC par le DGDG en carence de Pi serait donc limité afin de maintenir les propriétés biophysiques naturelles des membranes extraplastidiales.

Ainsi, les stratégies d'adaptation à la carence de Pi semblent avoir nettement divergé au cours de l'évolution de la lignée verte. Bien que ses fonctions soient encore partiellement connues, le DGTS apparaît comme un lipide d'intérêt majeur dans ces mécanismes d'adaptation et sa disparition chez les plantes supérieures soulève un grand nombre d'interrogations. Selon la littérature, le DGTS est

considéré comme un analogue de la PC ; ces deux lipides partagent une structure similaire et semblent se substituer parfaitement l'un à l'autre chez certains organismes (Riekhof et al., 2014). Cependant, cette hypothèse ne semble pas s'appliquer à l'ensemble des espèces. Chez les algues d'eau douce et les plantes primitives, il y a généralement une prédominance d'un lipide par rapport à l'autre, voire une absence complète de l'un des deux. La microalgue d'eau douce *C. reinhardtii* illustre parfaitement ce dernier cas car elle synthétise le DGTS à l'exclusion totale de la PC (Eichenberger & Boschetti, 1978). Ces observations remettent ainsi en question la nature interchangeable du DGTS et de la PC. Une étude récente réalisée sur des membranes synthétiques a également mis en doute la compatibilité de ces deux lipides chez les organismes terrestres (Bolik et al., 2023). Les travaux réalisés ont montré que les propriétés physiques de la PC et du DGTS étaient différentes ; les membranes de DGTS sont plus épaisses et plus sensibles à l'hydratation que les membranes constituées de PC, probablement en raison des différences dans la structure de leur tête polaire (**Figure 15**). Il a été proposé que la coexistence du DGTS et de la PC au sein d'une même membrane peut être réalisée par une modification de leur composition en acides gras. Ce mécanisme pourrait se produire chez les organismes marins dans lesquels le DGTS est enrichi en VLC-PUFAs et la PC enrichie en acides gras à chaîne moyenne. Cette variation de la composition en acides gras permettrait de maintenir l'épaisseur de la membrane et de préserver ainsi son intégrité. A l'inverse, les algues d'eau douce et les plantes terrestres ne produisent pas de VLC-PUFAs et sont donc incapables de faire varier l'épaisseur de leurs membranes (**Figure 15**). La présence du DGTS chez ces organismes serait donc probablement délétère, ce qui pourrait expliquer l'absence de ce lipide chez les plantes terrestres (Bolik et al., 2023). La perte de la production du DGTS chez ces organismes serait également expliquée par le changement d'environnement ayant eu lieu au cours de la terrestrialisation des plantes. A l'inverse du milieu aquatique, le milieu terrestre est un environnement où la disponibilité en eau est limitante et la pression osmotique très variable. L'adaptation des plantes à ce milieu terrestre a été marquée par la perte de la tolérance à la dessiccation lors de l'émergence des trachéophytes (Oliver et al., 2000). La perte du gène *BTA1* chez ces organismes semble être concomitante à cet événement et y serait donc peut-être liée (Bolik et al., 2023). De plus, les faibles quantités de DGTS produites chez les trachéophytes primitives semblent être dégradées pendant les périodes de sécheresse (Guschina et al., 2002; Rozenstvet, 2004; Rozenstvet et al., 2001), consolidant ainsi l'hypothèse selon laquelle le DGTS est délétère dans les environnements limités en eau.

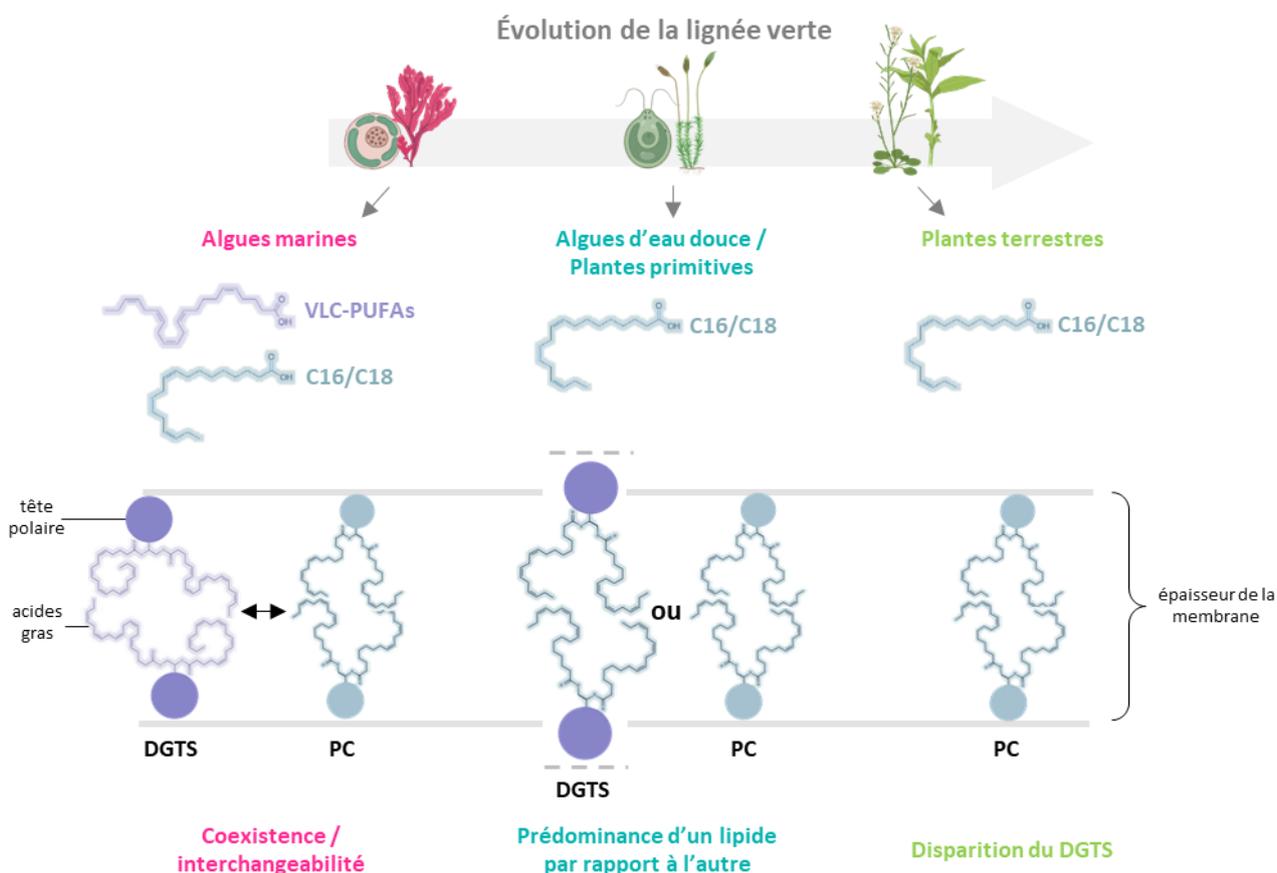


Figure 15. Hypothèse expliquant la disparition du DGTS chez les organismes de la lignée verte, selon (Bolik *et al.*, 2023). Chez les algues marines, le DGTS est composé de VLC-PUFAs tandis que la PC est composée d'acides gras en C16 ou C18. Ces différentes compositions permettent d'ajuster l'épaisseur de la membrane. Chez les algues d'eau douce ou les plantes primitives, le DGTS et la PC sont tous-deux composés d'acides gras en C16 ou C18. La tête polaire du DGTS est plus volumineuse que celle de la PC ; une membrane composée de DGTS est donc plus épaisse qu'une membrane composée de PC. Chez les plantes terrestres, la PC est le composant majoritaire des membranes extraplastidiales et le DGTS est totalement absent.

C16/C18, acide gras à 16 ou 18 carbones ; **VLC-PUFAs**, Very-Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids.

Ainsi, les travaux menés par (Bolik *et al.*, 2023) ont permis d'avancer les premières hypothèses expliquant la perte progressive de la synthèse du DGTS chez les organismes de la lignée verte. Ce lipide ne semble pas être adapté à l'environnement terrestre et c'est probablement la raison pour laquelle la PC est dominante chez les plantes supérieures. Ce projet de thèse vise à consolider cette hypothèse par des expériences *in vivo*. L'objectif est de générer des plantes transgéniques capables de synthétiser le DGTS et d'étudier l'impact de cette production sur leur phénotype, leur physiologie et l'homéostasie de leurs membranes. Chez les algues, le DGTS permet de remplacer une grande partie des phospholipides dégradés lors de la carence de Pi ; le but de cette étude est donc de vérifier si ce mécanisme est toujours opérant chez les plantes et s'il peut éventuellement améliorer leur tolérance. Ce projet a ainsi pour visée de mieux comprendre l'évolution des stratégies d'adaptation à la carence

de Pi chez les organismes de la lignée verte. Les résultats de ce travail ont permis la rédaction d'un article de recherche qui est présenté dans la partie suivante.

2. Résultats de l'étude

Article de recherche : Betaine lipids overproduced in seed plants are excluded from plastid membranes and promote endomembrane expansion

Sarah Salomon¹, Marion Schilling¹, Catherine Albrieux¹, Grégory Si Larbi¹, Pierre-Henri Jouneau², Sylvaine Roy¹, Denis Falconet¹, Morgane Michaud¹ and Juliette Jouhet¹

1 Laboratoire Physiologie Cellulaire et Végétale, Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG, Grenoble, France.

2 Laboratoire Modélisation et Exploration des Matériaux, CEA, Univ. Grenoble Alpes; IRIG, Grenoble, France

Corresponding Author juliette.jouhet@cea.fr

Running title: DGTS synthesis in seed plants

N.B.1 : Cet article est encore en cours de soumission, il est accessible sur la plateforme BioRxiv.org via le lien suivant : <https://doi.org/10.1101/2024.07.11.603045>

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

Betaine lipids overproduced in seed plants are excluded from plastid membranes and promote endomembrane expansion

Sarah Salomon¹, Marion Schilling¹, Catherine Albrieux¹, Grégory Si Larbi¹, Pierre-Henri Jouneau², Sylvaine Roy¹, Denis Falconet¹, Morgane Michaud¹ and Juliette Jouhet¹

1 Laboratoire Physiologie Cellulaire et Végétale, Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG, Grenoble, France.

2 Laboratoire Modélisation et Exploration des Matériaux, CEA, Univ. Grenoble Alpes; IRIG, Grenoble, France

Corresponding Author juliette.jouhet@cea.fr

Running title: DGTS synthesis in seed plants

Keywords: Betaine lipid; Seed plant; Phosphate starvation; Phospholipid; Chloroplast; Endomembrane

Highlight: Betaine lipids, algae non phosphorus lipids, could be produced in seed plants where they are normally absent. Their synthesis promotes endoplasmic reticulum expansion without affecting significantly the other glycerolipids.

Abstract (250 words)

Plants and algae have to adapt to environmental changes and face various stresses that negatively affect their growth and development. One common stress is phosphate (Pi) deficiency, which is often present in the environment at limiting levels. In response to Pi deficiency, these organisms increase Pi uptake and remobilize intracellular Pi. Phospholipids are degraded to provide Pi and replaced by non-phosphorus lipids, such as glycolipids or betaine lipids. During evolution, seed plants lost the ability to synthesize betaine lipids. By expressing BTA1 genes, which are involved in the synthesis of diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethyl-homoserine (DGTS), from different species, our work shows that DGTS can be produced in seed plants. In Arabidopsis, expression of BTA1 under a phosphate starvation-inducible promoter resulted in limited DGTS production without having any impact on plant growth or lipid remodeling. In transient expression systems in *Nicotiana benthamiana*, leaves were able to accumulate DGTS up to 30 % of their glycerolipid content at a slight expense of galactolipid and phospholipid production. At the subcellular level, we showed that DGTS is absent from the plastids and seems to be enriched in the endomembranes, driving an ER membrane proliferation. Finally, the DGTS synthesis pathway seems to compete with PC synthesis via the Kennedy pathway but does not seem to be derived from the PC diacylglycerol backbone and therefore does not interfere with the eukaryotic pathway involved in galactolipid synthesis.

Introduction

Plants and algae are organisms that must constantly adapt to changes in their environment and, consequently, face numerous stresses such as nutrient deficiency, water scarcity, temperature fluctuations, or attacks from various pathogens. These stresses can negatively affect the growth and development of these organisms, thereby significantly impacting raw material production yields. Phosphate (Pi) deficiency is one of the most common nutrient stresses, leading to yield reductions ranging from 25% to 60% in various crops (Nelson and Janke, 2007; Smit *et al.*, 2009; Vitousek *et al.*, 2009). Pi is an essential nutrient for the survival of all living organisms. Plants and algae acquire the Pi they need for growth and development from the soil or aquatic environment. However, despite its abundance, this nutrient is not evenly distributed and is often present in forms that cannot be easily assimilated by plants (Tiessen, 2008). This low Pi availability is often compensated by the use of phosphorus-enriched fertilizers, which contribute to significant soil and water pollution. To reduce the dependence on these fertilizers while enhancing crop yields, it is essential to understand the mechanisms by which photosynthetic organisms adapt to Pi deficiency (Cuyas *et al.*, 2023).

In response to Pi deficiency, photosynthetic organisms activate adaptation mechanisms to increase Pi uptake from the environment and remobilize intracellular Pi reserves. In cells, Pi is primarily stored in the vacuole but is also found in significant quantities in various biomolecules such as nucleic acids and certain lipids (Poirier and Bucher, 2002). Approximately one third of intracellular Pi is stored in plant phospholipids, the main constituents of extraplastidial cell membranes (Poirier *et al.*, 1991). During Pi deficiency, a portion of these membrane phospholipids is degraded to release Pi, which is then replaced by non-phosphorous lipids to maintain cell membrane integrity (Jouhet *et al.*, 2004; Van Mooy *et al.*, 2009; Hölzl and Dörmann, 2019). When Pi is limiting in plants, glycolipids can substitute for phospholipids in cell membranes: sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) replaces phosphatidylglycerol (PG) in photosynthetic membranes, and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) substitutes for phospholipids in extraplastidial membranes (Jouhet *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2005; Bolik *et al.*, 2022). However, even after prolonged Pi deficiency, only a fraction of the phospholipids is degraded, limiting intracellular Pi remobilization and halting cell growth, possibly due to the differing physicochemical properties of phospholipids and glycolipids (Kanduč *et al.*, 2017).

Algae, as along with some fungi, bacteria or bryophytes, are able to synthesize another class of non-phosphorous glycerolipids called betaine lipids. Currently, three types of betaine lipids have been identified in photosynthetic organisms: diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethyl-homoserine (DGTS), diacylglycerylhydroxymethyl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanine (DGTA), and diacylglycerylcarboxy-*N*-hydroxymethylcholine (DGCC) (Sato, 1992; Dembitsky, 1996; Kato *et al.*, 1996). In algae, it is often suggested in the literature that these two lipid classes (*i.e.* phospholipids and betaine lipids) are interchangeable. Indeed, betaine lipids are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) (Riekhof *et al.*, 2005b; Zhang *et al.*, 2016) and localize in extraplastidial membranes (Eichenberger *et al.*, 1993; Künzler *et al.*, 1997) like phosphatidylcholine (PC), the most abundant phospholipid in extraplastidial membranes. Betaine lipids also share a trimethyl-nitrogen fragment with PC (Eichenberger *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1996). Furthermore, *Chlamydomonas reinhardtii* lacks PC but contains only DGTS (Yang *et al.*, 2004), and in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, PC can be replaced by DGTS without major impact on cell growth (Riekhof

et al., 2014). However, across a wide range of organisms, no correlation has been found between DGTS and PC content (Künzler and Eichenberger, 1997). The complementary association between betaine lipids and phospholipids has long been considered an adaptive strategy for coping with periodic Pi deficiency in the natural environment. However, the degree of change in cellular betaine lipid and PC contents in response to fluctuations in external Pi availability varies significantly among species (Cañavate *et al.*, 2017) and the physicochemical properties of the betaine lipids differ from those of PC, with DGTS bilayers being thicker, more rigid and more repulsive than PC bilayers (Bolik *et al.*, 2023).

These species-specific differences suggest metabolic diversity among algae, as well as versatility in betaine lipid function and requirement under Pi-starved conditions (Cañavate *et al.*, 2016). Yet we lack a comprehensive understanding of betaine lipid functions. Despite the need for further research on betaine lipids in microalgae, only a few studies have been conducted since the initial works compiled by (Dembitsky, 1996). The presence and characterization of betaine lipids in cells are currently based on biochemical analyses, which cover only a limited range of organisms (Dembitsky, 1996; Künzler and Eichenberger, 1997; Makewicz *et al.*, 1997; Vaskovsky *et al.*, 1998; Cañavate *et al.*, 2016). In a simplified view, betaine lipids are present in lower plants, algae and some fungi but even these groups show several exceptions and betaine lipids are absent from seed plants, i.e. gymnosperms and angiosperms (Rozentsvet, 2004). All these studies were conducted prior to updates in the classification and the use of genetic tools to improve phylogenetic analysis. Since the genes responsible for DGTS synthesis were identified in 2005 (Riekhof *et al.*, 2005*b,a*), new phylogenetic analysis of DGTS biosynthesis enzymes have been possible (Murakami *et al.*, 2018; Bolik *et al.*, 2023), as well as genome searches for DGTS synthase genes, confirming the absence of DGTS synthesis enzymes in the genomes of seed plants. DGTS biosynthesis was first discovered in bacteria and is realized in two steps by the two enzymes BtaA and BtaB whereas in *Chlamydomonas*, in fungi and more generally in eukaryote, it is catalyzed by a single bifunctional enzyme, Bta1, containing both the BtaA and BtaB domains. BtaA uses diacylglycerol (DAG) and S-adenosylmethionine (SAM) as substrates to produce diacylglycerol-O-homoserine, which is subsequently used by BtaB to produce DGTS through the sequential addition of three methyl groups to the nitrogen atom using SAM as the methyl donor (Riekhof *et al.*, 2005*a,b*). The DGCC synthesis pathway is not yet known, and DGTA is hypothesized to be synthesized from DGTS, but the enzyme responsible for this conversion remains unidentified (Sato, 1991).

The goal of this work is to investigate the effect of betaine lipid production on seed plant development and Pi starvation stress response, to understand why the capacity to synthesize betaine lipids was lost during land plant evolution. We chose to produce DGTS in flowering plants because DGTS (1) is the most widely distributed betaine lipids and is present in lower plants, and (2) it is the only betaine lipid for which the genes and synthesis pathways have been characterized in different organisms. We generated DGTS in plants either by producing transgenic *Arabidopsis* lines expressing Bta1 under the control of a phosphate starvation inducible promoter, pMGD3 (Shimajima *et al.*, 2015), or by transiently overexpressing Bta1 under the 35S promoter in *Nicotiana benthamiana*. Our results indicate that DGTS is accumulating in extraplastidial membranes, leading to ER proliferation. DGTS production does not seem to improve growth or affect lipid remodeling in phosphate starvation.

Material and Methods

Plant Materials and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Col0 plants were used as the wild-type. Two independent T-DNA insertion lines in the Col0 background were obtained with the pMGD3-Sec63TM- Mg BTA1-HAx3 construction (Figure S1) using the *BTA1* gene from *Microchloropsis gaditana* (Naga_100016g36). The presence of the T-DNA was verified by PCR using a forward primer (ctggatgggggccagaagg) located on the *MgBTA1* gene and a reverse primer (agaagcgtagtcttgaacgtcgtatgggtactgggcttttgattgcccgg) located on the junction between *MgBTA1* gene and the HAx3 tag.

Calli were obtained from mesophyll tissue of two week old *Arabidopsis* leaves, and grown on Murashige and Skoog (MS) (MSP09, Caisson Laboratories, Inc, USA) agar plates supplemented with 3 % (w/v) sucrose, 1.2 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.8 % (w/v) agar. After formation, the calli were maintained in 200 mL of liquid MS (MS without KH₂PO₄, Duchefa Biochemie) supplemented with 0.5 mM of phosphate, 1.5 % (w/v) sucrose and 1.2 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. The calli were maintained under continuous light (100 μE.m⁻².s⁻¹) at 22°C, agitated by rotary shaking at 125 rpm and subcultured every 7 days. For phosphate starvation experiments, the calli were washed three times with 50 mL of MS medium -Pi (MS without KH₂PO₄, Duchefa Biochemie) with 0.5 mM Pi or without Pi and grown for 4 or 8 days in MS with 0.5 mM or without Pi.

The *Arabidopsis* mutant and Col0 seedling lines were grown *in vitro* on MS medium (MS without KH₂PO₄, Duchefa Biochemie) supplemented with 1 % (w/v) sucrose, 1,2% (w/v) agar (A7921, Sigma-Aldrich) and 1 mM Pi for the Pi replete condition and 0.005 mM Pi for the Pi depleted condition. Seedlings were grown for 21 days under long day conditions (16h-8h light-dark photoperiod) at 20-22°C with a photon flux density of 30-60 μmol/m²/s. The leaf portion above the hypocotyl was harvested from 21-day-old *Arabidopsis* seedlings, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Nicotiana benthamiana wild type plants were grown under long day conditions (16h-8h light-dark photoperiod) at 18-20°C with 60-70% humidity and a photon flux density of 100-120 μmol/m²/s. Plants were grown for 4 to 5 weeks on soil (35 L) supplemented with vermiculite (7 L) and biological fungicide (Prestop, Lallemand, 10 g) and watered 3 times per week before agroinfiltration.

Arabidopsis transgenic line construction

Genes were cloned into the pFP108 plant expression vector (To *et al.*, 2006) in frame with 3xHA tags added in C-terminal (pFP108-3xHA) and the pMGD3 promoter. Expression of genes from this vector is under the control of a NOS terminator (Figure S1A). The plasmids were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 and used for stable transformation of Col0 plants by floral dip. Transformed plants were selected using Basta® and two independent lines expressing the constructs were selected for further analysis which we named pMGD3-MgBTA1-1 and pMGD3-MgBTA1-2. Leaves from F2 plants of these two lines were used for callus formation.

Cloning of BTA1 fused proteins used for transient expression in *Nicotiana benthamiana*

Bta1 sequences from *Kluyveromyces lactis* (KLLAO_F22198g, KIBta1), *Marchantia polymorpha* (MARPO_0023s0088, MpBta1) and *Chlamydomonas reinhardtii* (CHLRE_07g324200v5, CrBta1), were synthesized with codon optimization for expression in *A. thaliana* using the GeneArt synthesis service (ThermoFischer). The optimized sequences are provided in [Supplementary Data 1](#). Forward/reverse primers used were atttcatttggagaggacacgctgacaagctgacATGTTCCGGCTACATGAAGCACG/aagaagcgtagtcttgaacgtcgtatgggtaATTGTTCTCGAGGTCGAGTGAAG for KIBta1, tcatttggagaggacacgctgacaagctgacATGGTGTGGAAAGCGTGAAGG/aagaagcgtagtcttgaacgtcgtatgggtaCTTGGCATCGGTAGGAGTGC for MpBta1 and ttcttggagaggacacgctgacaagctgacATGGGATCTGGAAGAGATGGAAGG/ccaaagaagcgtagtcttgaacgtcgtatgggtaATTGTCCTTCTTAGCGCCCTTAC for CrBta1. MgBta1 gene (Naga_100016g36) was amplified from *Microchloropsis gaditana* cDNA with forward primer tttggagaggacacgctgacaagctgacatgtgcaatgttctcgcgat and reverse primer agaagcgtagtcttgaacgtcgtatgggtactgggcttttgattgcccg without codon optimization.

For PtBTA1-GFP construction, the coding sequence of *PtBta1* gene (Phatr3_J42872) was amplified from *Phaeodactylum tricorutum* cDNA with forward primer gagaggacacgctgacaagctgactctagaATGATTGCCAGTCTCAAATCAC and reverse primer agtgaaaagtcttctcttactggatccGTCCGTCTTTTTTCTTCGCC without codon optimization. For nf-PtBTA1-GFP construction, the *PtBta1* gene (Phatr3_J42872) was amplified from *Phaeodactylum tricorutum* genomic DNA with forward primer catttggagaggacacgctgacaagctgacatgccggagatgcgttccc and reverse primer aagcgtagtcttgaacgtcgtatgggtactgggcttttttcttcgcc without codon optimization.

For construct without GFP; all amplified *Bta1* genes were then cloned into the pFP108 plant expression vector in frame with 3xHA tag by Gibson assembly (Gibson *et al.*, 2009). For MgBTA1-GFP and nf-BTA1Pt-GFP constructs, amplified *Bta1* genes were cloned into the pFP108 plant expression vector (To *et al.*, 2006) in frame with 3xHA tags and GFP sequence in C-terminal and Sec63 (AtERDJ2B, AT4G21180) transmembrane fragment (aa 1-233) in N-terminal. For PtBTA1-GFP construct, the amplified *BTA1* gene was cloned into the pFP108 plant expression vector in frame with the GFP sequence in C-terminal (Figure S1). The expression of the genes from this vector is under the control of two 35S promoters and a NOS terminator. The plasmids were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain and used for transient transformation of *N. benthamiana* leaves by agroinfiltration.

***Nicotiana benthamiana* agroinfiltration**

A. tumefaciens carrying Bta1 plasmids were cultivated in 10 mL of LB medium containing the appropriate antibiotics supplemented with acetosyringone (20 µM) during 24h at 28°C with 180 rpm agitation. The *A. tumefaciens* strain expressing the P19 protein was used in addition to all agroinfiltrations under the same conditions as the *A. tumefaciens* transformants. Cultures were centrifuged at 4000 rpm for 10 min. The pellets were resuspended in 5 mL of agroinfiltration buffer (MgCl₂ 1 mM, acetosyringone 200 µM) and further diluted to obtain 10 mL of cell suspensions at OD_{600nm}=1. Each transformed *Agrobacterium* strain was mixed with the P19 strain in a 1:1 (v:v) ratio. P19 alone was also used as a control. Infiltration was performed with a 1 mL syringe on the abaxial side of leaves of 4- to 5-week old *N. benthamiana* plants. Plants were maintained for 4 or 8 days

after agroinfiltration and excised for microscopy and chloroplast purification or ground in liquid nitrogen for western blot and lipid analysis.

Confocal Microscopy

Laser scanning confocal microscopy was performed on a Zeiss LSM880 microscope equipped with a 63x/1.4 oil-immersion Plan-Apochromat objective, using Zen 2.3 SP1 acquisition software (Platform μ Life, IRIG, LPCV). Excitation/emission wavelengths were 488/493 to 570 nm for GFP and 561/582 to 622 nm for RFP. Images were visualized and processed using ImageJ 1.53a software with the Fiji image processing package. For the fluorescence quantification, 30 images per sample from three independent experiments were analyzed.

Starch quantification

Starch quantification was performed using the Starch Assay kit from Sigma-Aldrich® (SA20). Leaves of *N. benthamiana* plants were harvested 4 and 8 days after agroinfiltration and directly frozen in liquid nitrogen. After grinding, the samples were supplemented with 5 mL of 80% ethanol and heated 5 min at 85°C in a water bath. The samples were mixed and supplemented with another 5 mL of 80% ethanol before centrifugation at 1000 x *g* for 10 min. The following steps were performed according to the manufacturer's instructions. For the glucose assay, a standard curve was generated using 10, 20, 30, 40, and 50 μ g of the kit's glucose standard reagent and used to calculate the amount of glucose in μ g/mg of fresh weight. The experiment was repeated on 3 independent cultures of *N. benthamiana*.

Photosynthetic analysis

Chlorophyll fluorescence measurements were conducted on agroinfiltrated *N. benthamiana* plants on day 4 (four plants per measurements) at room temperature (RT) using a Speedzen 3 chlorophyll fluorescence imaging setup (JBeamBio, La Rochelle, France). Samples were dark-adapted for 30 min prior to analysis. In this setup, actinic light and saturating pulses were generated by red LEDs peaking at 630 nm, while measurement pulses (duration of 250 ms) were emitted by blue LEDs peaking at 470 nm. The detection time after each measurement pulse was set to 15 μ s and no binning was applied. The reported fluorescence value is an average of 10 different points on different leaves, each consisting of four pixels. The maximum quantum efficiency of PSII was calculated as $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, where F_o and F_m are the fluorescence emission measured before and at the end of a 200 ms saturating pulse in dark-adapted leaves, respectively. Φ PSII was calculated as $(F_m' - F)/F_m'$, where F is the steady-state fluorescence reached in the presence of illumination with actinic light and F_m' is the fluorescence emission measured at the end of a 200 ms saturating pulse, in the light-adapted leaves. The Electron Transport Rate (ETR) was calculated as $0.6 \times \text{PAR} \times \Phi$ PSII where 0.6 correspond to the average ratio of PSII reaction centers to PSI reaction centers and PAR is the irradiation light level in the PAR range (400nm to 700nm) in μ mol photons. \cdot m⁻².s⁻¹. Nonphotochemical quenching (NPQ) was recorded during 5 min of illumination at 672 μ mol photons. \cdot m⁻².s⁻¹ followed by 5 min of darkness. NPQ was calculated as $(F_m - F_m')/F_m'$ (Maxwell and Johnson, 2000). Data were obtained from three independent experiments with three biological samples.

Chloroplast purification

Agroinfiltrated plants were pre-incubated for 12 h at 4°C before chloroplast purification. 16 leaves (3-4 g) coming from 8 plants were cut and homogenized in a blender in 70 mL ice-cold buffer containing 0.4 M sorbitol, 20 mM tricine/KOH pH8.4, 10 mM EDTA pH 8.0, 10 mM NaHCO₃ and 0.15 % BSA (the supernatant was collected as the total fraction and stored at -80°C). A crude chloroplast pellet was obtained by centrifugation at 2070 x g for 2 min and further purified in 0.8 M sorbitol, 40 mM Hepes/KOH pH7.6, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA pH8.0, 20 mM NaHCO₃ (washing buffer) on a Percoll gradient previously prepared by centrifugation of 100% (v/v) Percoll in a JA20 rotor at 39191 x g for 55 min. After centrifugation at 9798 x g for 10 min, intact chloroplasts were recovered from the lower phase. The chloroplasts were washed with 38 mL of washing buffer and centrifuged at 1482 x g for 5 min in a JA20 rotor. The pellet was resuspended in 1 mL of washing buffer and stored at -80°C for further analysis as the purified chloroplast fraction. The supernatant obtained after the first centrifugation was collected and centrifuged for 1 h at 4°C at 255530 x g in a SW40 rotor. The pellet was resuspended in 1 mL of washing buffer and stored at -80°C as the extraplastidial membrane fraction.

Protein extraction and Western Blot Analysis

Proteins from *N. benthamiana* agroinfiltrated leaves were extracted from ground tissue with 200 µL of protein buffer (urea 8 M, Tris-HCl 50 mM pH 6.8, EGTA 1 mM, DTT 10 mM) and proteins from chloroplast purification fractions were extracted with 500 µL of protein buffer. Proteins were heated at 70°C under 500 rpm agitation for 5 min then quantified by Bradford assay (Invitrogen). 30 or 10 µg of proteins were used for migration on denaturing SDS-PAGE. After migration, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes for 1 hour at 25 Volt in transfer buffer MES SDS Running buffer 20x Bolt (Invitrogen). The membranes were stained with Ponceau red (Ponceau red 0.2% [w/v] and trichloroacetic acid 3% [v/v]) and used for western blots after destaining. Immunodetection was performed with anti-GFP-HRP (130-091-833, Miltenyi Biotec) and anti-BIP2 (AS09481, Agrisera) antibodies. The anti-LHCP antibody was kindly provided by Olivier Vallon (IBPC, Paris).

Transmission Electronic Microscopy

N. benthamiana leaves were prepared as previously described (Flori *et al.*, 2018). Briefly, samples were fixed in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde for 1 h at room temperature, under vacuum using a desiccator and then stored overnight at 4 °C. The samples were then washed five times in 0.1 M PB (pH 7.4), the buffer was removed directly by pipetting. Samples were fixed by incubation for 2 h on ice in 0.1 M PB (pH 7.4) containing 2% osmium and 1.5% potassium ferricyanide before washing five times with 0.1 M PB (pH 7.4). Samples were incubated in 0.1 M PB (pH 7.4) containing 0.1% tannic acid and incubated for 30 min in the dark at room temperature. The samples were again washed five times with 0.1 M PB (pH 7.4), dehydrated in ascending sequences of ethanol, and infiltrated with ethanol/ EMBED-812 resin mixture. Finally, the samples were embedded in EMBED-812. Ultrathin sections (70–100 nm) were cut with a diamond knife on a PowerTome ultramicrotome (RMC Products, Tucson, AZ, USA) and collected on 200 Mesh copper grids. Samples for **Figure 7A and S8** were visualized by scanning transmission electron microscopy (STEM) using a FEI Tecnai microscope (FEI, USA) set up at 200 KV. For **Supplementary Movies and Figure 7B and C**, focused ion beam (FIB) tomography was

performed using a Zeiss CrossBeam 550 microscope (Zeiss, Germany), equipped with Fibics Atlas 3D tomography software as previously described (Uwizeye *et al.*, 2021). The resin block containing the cells was fixed on a stub with silver paste, and surface abraded with a diamond knife in a microtome to obtain a perfectly flat and clean surface. The entire sample was metallized with 4 nm of platinum to avoid charging during observation. Inside the FIB-SEM, a second layer of platinum (1-2 μm) was deposited locally on the analyzed area to mitigate possible curtaining artefacts. The sample was then abraded slice by slice with the Ga^+ ion beam (generally with a current of 700 nA at 30 kV). Each freshly exposed surface was imaged by scanning electron microscopy (SEM) at 1.5 kV and with a current of ~ 1 nA using the in-column EsB backscatter detector. The simultaneous milling and imaging mode was used for better stability, with an hourly automatic correction of focus and astigmatism. For each slice, a thickness of 6 nm was removed, and SEM images were acquired with a pixel size of 6 nm, resulting in an isotropic voxel size of $6 \times 6 \times 6 \text{ nm}^3$. From the aligned FIB-SEM stack, the region of interest denoting the cell was cropped to remove unnecessary background using the Fiji software (<https://imagej.net/Fiji>). The 3D segmentation, reconstruction and visualization was achieved using Dragonfly software (www.theobjects.com/dragonfly). Surface areas and volumes were calculated directly from the Dragonfly software.

Lipid Analysis

Glycerolipids were extracted from plant samples frozen in liquid nitrogen immediately after harvest. Once freeze-dried, plants were crushed and suspended in 4 mL boiling ethanol for 5 minutes to prevent lipid degradation, and lipids were extracted by adding 2 mL methanol and 8 mL chloroform at room temperature according to (Simionato *et al.*, 2013). The mixture was then saturated with argon and stirred for 1 hour at room temperature. After filtration through glass wool, the cell debris was rinsed with 3 mL chloroform/methanol 2/1 (v/v) and 5 mL NaCl 1% was added to the filtrate to initiate biphasic formation. The chloroform phase was dried under argon before the lipid extract was solubilized in pure chloroform. Total glycerolipids were quantified from their fatty acids: a known amount of C15:0 was added to an aliquot fraction and the fatty acids present were converted to methyl esters (FAME) by a 1-hour incubation in 3 mL 2.5% H_2SO_4 in pure methanol at 100°C (Jouhet *et al.*, 2003). The reaction was stopped by adding 3 mL water and 3 mL hexane. The hexane phase was analyzed by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID) (Perkin Elmer) on a BPX70 (SGE) column. FAME were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma) and quantified by the surface peak method using C15:0 for calibration.

Lipid extracts corresponding to 25 nmol of total fatty acids were dissolved in 100 μL of chloroform/methanol 2/1 (v/v) containing 125 pmol of each internal standard. The internal standards used were PE 18:0-18:0 and DAG 18:0-22:6 from Avanti Polar Lipid and SQDG 16:0-18:0 extracted from spinach thylakoid (Demé *et al.*, 2014) and hydrogenated as described in (Buseman *et al.*, 2006). The lipids were then separated by HPLC and quantified by MS/MS.

The HPLC separation method was adapted from (Rainteau *et al.*, 2012). Lipid classes were separated on an Agilent 1260 Infinity II HPLC system using a 150 mm \times 3 mm (length \times internal diameter) 5 μm diol column (Macherey-Nagel), at 40°C . The mobile phases consisted of hexane/isopropanol/water/ammonium acetate 1M, pH5.3

[625/350/24/1, (v/v/v/v)] (A) and isopropanol/water/ammonium acetate 1M, pH5.3 [850/149/1, (v/v/v)] (B). The injection volume was 20 μ L. After 5 min, the percentage of B was increased linearly from 0% to 100% in 30 min and remained at 100% for 15 min. This elution sequence was followed by a return to 100% A in 5 min and equilibration with 100% A for 20 min before the next injection, resulting in a total runtime of 70 min. The flow rate of the mobile phase was 200 μ L/min. The different glycerophospholipid classes were eluted sequentially as a function of the polar head group.

Mass spectrometric analysis was performed on a 6470 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent) equipped with a Jet stream electrospray ion source with the following settings: Drying gas heater: 230°C, Drying gas flow 10 L/min, Sheath gas heater: 200°C, Sheath gas flow: 10L/min, Nebulizer pressure: 25 psi, Capillary voltage: \pm 4000 V, Nozzle voltage \pm 2000. Nitrogen was used as collision gas. Quadrupoles Q1 and Q3 were operated at widest and unit resolution respectively. DGTS and PC analysis was performed in positive ion mode by scanning for precursors at m/z 236 and 184 at a collision energy (CE) of 55 and 35 eV, respectively. SQDG analysis was performed in negative ion mode by scanning for precursors at m/z -225 at a CE of -55eV. PE, PI, PG, PS, MGDG and DGDG measurements were performed in positive ion mode by scanning for neutral losses of 141 Da, 277 Da, 189 Da, 185 Da, 179 Da and 341 Da at CEs of 29 eV, 21 eV, 25 eV, 21eV, 8 eV and 11 eV, respectively. Quantification was performed by multiple reaction monitoring (MRM) with a 30 ms dwell time. DAG and TAG species were identified and quantified by MRM as singly charged ions $[M+NH_4]^+$ at a CE of 19 and 26 eV respectively with a 30 ms dwell time. DPG species were quantified by MRM as singly charged ions $[M-H]^-$ at a CE of -54 eV with a 50 ms dwell time. Mass spectra were processed using MassHunter Workstation software (Agilent) for identification and quantification of lipids. Lipid amounts (pmol) were corrected for response differences between internal standards and endogenous lipids and by comparison with a quantified control (QC) using an in-house software developed by the LIPANG platform. The QC extract corresponds to a known mixed lipid extract from *Chlamydomonas* and *Arabidopsis* cell cultures qualified and quantified by TLC and GC-FID as described by (Jouhet *et al.*, 2017).

Statistical analysis

For photosynthesis measurements, normality was tested using Skewness and Kurtosis tests. Since the data followed a normal distribution, the statistical differences between samples were analyzed using the parametric two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

The fluorescence quantification and lipid analysis data did not follow a normal distribution, so a non-parametric test was used for the analyses. The Kruskal-Wallis pairwise comparison test followed by the Benjamini, Krieger and Yekutieli post-hoc test was used to detect significant differences between samples. As the Benjamini, Krieger and Yekutieli post-hoc test is more conservative, it was used to minimize the risk of false positive results.

Results

Selection of DGTS synthase genes for DGTS production in plants

Bta1 genes from various species were identified using a BLAST search with the protein sequence of *Chlamydomonas reinhardtii* BTA1. To identify BTA1 enzymes that are functional in higher plants, five Bta1

sequences from different lineages were selected for functional tests by transient expression in *Nicotiana benthamiana*. Therefore, Bta1 cDNA from *Microchloropsis gaditana* (MgBta1, eustigmatophyte), *Phaeodactylum tricorutum* (nf-PtBta1, diatom), *Kluyveromyces lactis* (KlBta1, fungus), *Marchantia polymorpha* (MpBta1, bryophyte) and *Chlamydomonas reinhardtii* (CrBta1, green algae) were cloned under the control of the 35S promoter and transiently overexpressed in *N. benthamiana* leaves by agroinfiltration (Figure S1A). Eight days after infiltration, lipids were extracted from the leaves and separated by thin layer chromatography (TLC) (Figure 1). A lipid spot corresponding to DGTS was clearly identified when the enzymes of *M. gaditana*, *K. lactis*, *M. polymorpha* and *C. reinhardtii* were expressed, showing that DGTS could be produced in higher plants by expressing a BTA1 protein. These results also confirmed that the Bta1 genes of *M. polymorpha* and *M. gaditana* encode functional enzymes. However, we did not detect DGTS production in leaves expressing the Bta1 construct from *P. tricorutum*. Upon further analysis of the annotated sequence retrieved from the Joint Genome Institute (JGI), we noticed an intron, not initially annotated, present in the N-terminus sequence that was cloned from the genomic DNA of *P. tricorutum* (Figure S1B). Consequently, we cloned the correct version of the *Phaeodactylum* gene from cDNA. To ensure that the absence of DGTS synthesis was not due to a defect in ER addressing, we fused both *P. tricorutum* and *M. gaditana* constructs to the N-terminal ER transmembrane domains of Sec63. We then transiently expressed both constructs in *N. benthamiana* leaves. To better separate DGTS from endogenous lipids, we performed 2D-TLC with lipids extracted from non-transformed plants or plants transformed with the new *P. tricorutum* BTA1 construction (thereafter named PtBTA1) and MgBTA1 as a positive control (Figure S2). This experiment showed that PtBta1 was indeed functional but produced DGTS at a lower level in *N. benthamiana* compared to MgBta1, probably due to differences in expression levels of the two proteins (see below). Thus, the presence of the N-terminal intron leads to the production of a non-functional enzyme that we named nf-PtBTA1. For further experiments, MgBta1, PtBta1, and nf-PtBta1 constructs were chosen for strong, moderate and inefficient DGTS production in plant, respectively.

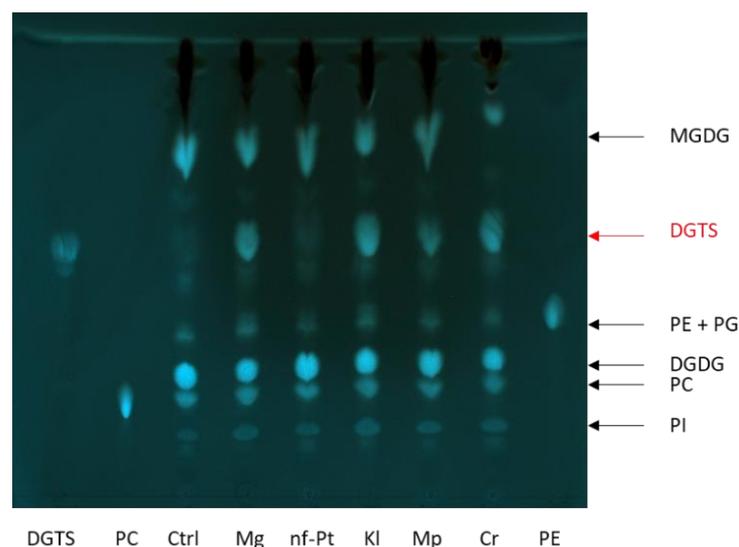


Figure 1. TLC analysis of lipids extracted from *Nicotiana benthamiana* leaves transiently expressing different Bta1 genes. Lipid control for migration: DGTS, PC and PE. The arrow in red indicates the DGTS position, the arrows in black the endogenous glycerolipids (MGDG, PE, PG, DGDG, PC and PI). Ctrl corresponds to leaf extract without

Bta1, all other lines (Mg, nf-Pt, Kl, Mp, Cr) correspond to leaf extract expressing different genes of Bta1. Mg: *Microchloropsis gaditana*; nf-Pt: non functional *Phaeodactylum tricornutum*; Kl: *Kluyveromyces lactis*; Mp: *Marchantia polymorpha*; Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*. MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine.

Analysis of Arabidopsis seedlings producing DGTS under phosphate starvation.

We initially attempted to transform Arabidopsis with the highly active *MgBta1* under the control of the 35S promoter. However, we were unable to obtain transformed seeds expressing the transgene, suggesting that high expression of Bta1 in *A. thaliana* might have a deleterious effect. We then decided to express *MgBta1* under a phosphate starvation inducible promoter, pMGD3 (Figure S1C) (Shimajima *et al.*, 2015). To ensure that the production of DGTS was localized in the ER, where it is supposed to occur in algae (Riekhof *et al.*, 2005a; Zhang *et al.*, 2016) and where PC synthesis takes place (Nakamura, 2021), we targeted the construction to the ER by adding the transmembrane fragment of Sec63. We selected two independent lines from separate transformation events that contained the transgene (Figure S3) and synthesized DGTS in response to phosphate starvation (see below). These independent lines were named pMGD3-MgBta1-1 and pMGD3-MgBta1-2 and we characterized them on two different systems: seedlings grown on plates and callus cell cultures. Non-transformed Col0 plants were used as controls.

Col0, pMGD3-MgBta1-1 and pMGD3-MgBta1-2 seeds were grown for 21 days *in vitro* on MS medium with or without Pi (Figure 2A). As expected, the absence of Pi severely slowed down plant growth, but no major phenotypic difference was detected between Col0 and the lines expressing BTA1 under both conditions. Lipids were extracted from the rosette leaves and analyzed by HPLC-MS/MS (Figure 2B and C). Under +Pi conditions, lipid content was similar between Col0 and the BTA1 overexpressors (Figure 2B), and no significant differences in lipid composition were observed between Col0 and the mutants (Figure 2C). Furthermore, DGTS was barely detected in the mutants, confirming that genes under the control of pMGD3 are not expressed under +Pi condition. Under -Pi conditions, the plant lipid content slightly decreased compared to +Pi conditions, but no significant difference between Col0 and the mutants was observed (Figure 2B). DGTS synthesis was induced in the mutants, reaching up to 4 % of total glycerolipids, but the rest of the glycerolipidome was not significantly affected. Phospholipids were degraded and DGDG production significantly increased during Pi starvation, as previously observed (Figure 2C) (Jouhet *et al.*, 2004). DGTS production did not seem to affect glycerolipid remodeling, likely because the induction of DGTS synthesis was not very strong.

We also analyzed the distribution of DGTS molecules under -Pi, as DGTS was barely detectable under +Pi conditions (Figure 2D). Each molecule is described first by the number of carbons in the acyl groups and secondly by the number of unsaturations. For example, DGTS 36:2 is a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-trimethylhomoserine in which the acyl groups at *sn*-1 and *sn*-2 positions contain 36 carbons in total and 2 double bonds. DGTS molecule distribution and desaturation patterns are similar to those of PC molecules (Figure 2E), with a slight enrichment of 34 C diacylglycerol backbone, corresponding to a C16 and a C18 fatty acid, compared to PC, which is enriched in 36 C diacylglycerol backbone, corresponding to two C18 fatty acids. Because *Microchloropsis* is an alga

containing very few fatty acids with C18 (Billey *et al.*, 2021), this difference could be due to the enzyme specificity. Chloroplast lipids (MGDG, DGDG, SQDG and PG) have distinctive lipid compositions (Figure 2F and Figure S4A-C) that differ from DGTS, and because DGTS composition is similar to PC, DGTS is likely produced in the ER by the Kennedy pathway. Thus, BTA1 enzyme seem to use the same DAG pool as PC (Karki *et al.*, 2019).

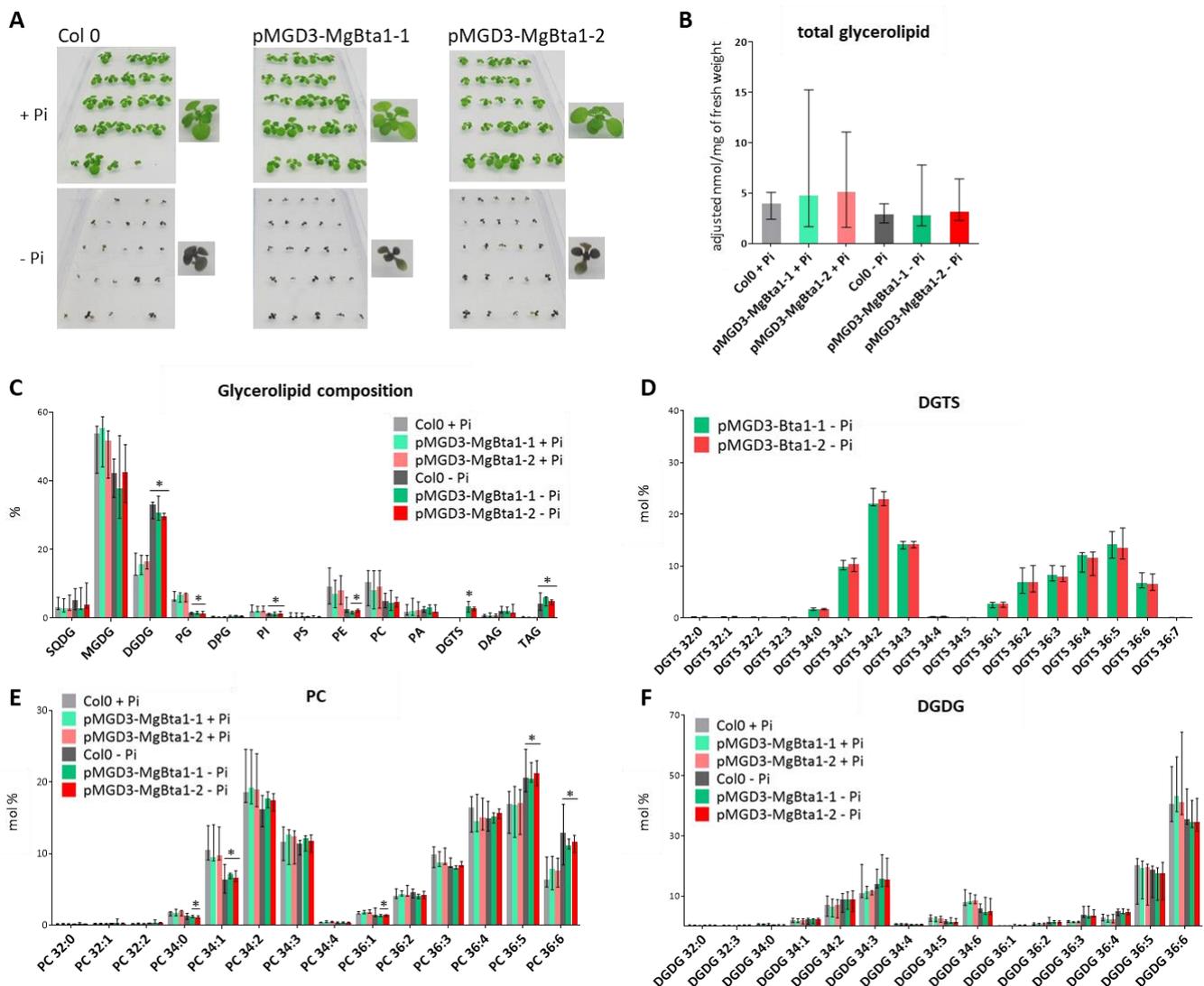


Figure 2. *pMGD3-MgBta1* seedlings analysis. (A) Pictures of *pMGD3-MgBta1-1*, *pMGD3-MgBta1-2* and Col0 seedlings grown during 21 days on MS medium supplemented with 1 mM Pi (+Pi) or 0.005 mM Pi (-Pi). (B) to (F) Lipid analysis of *pMGD3-MgBta1-1*, *pMGD3-MgBta1-2* and Col0 seedlings leaves grown during 21 days on MS medium supplemented with 1 mM Pi (+Pi) or 0,005 mM Pi (-Pi). Represented values correspond to the median of 5 biological replicates and the error bars represent the range between minimum and maximum values. (B) Quantity of glycerolipids in nmol per mg of rosette fresh weight. (C), (D), (E), (F) Glycerolipid distribution in mol % (C) and molecular distribution within DGTS (D), PC (E) and DGDG (F) classes determined by HPLC-MS/MS. The first number corresponds to the sum of the carbon numbers of the two fatty acids, and the second number to the number of unsaturations. Asterisks indicate significant differences ($*P < 0.05$) in comparison to +Pi condition by a Kruskal-Wallis test. SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; DPG, diphosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PA, phosphatidic acid; DGTS, ; DAG, diacylglycerol; TAG, triacylglycerol.

Analysis of DGTS production in Arabidopsis calli under phosphate starvation.

To confirm this hypothesis and to test the impact of DGTS production on the kinetic of lipid remodeling under phosphate starvation, calli were generated from the same Col0, pMGD3-MgBTA1-1 and pMGD3-MgBTA1-2 lines and cultivated under phosphate replete condition (+Pi) and phosphate starved condition (-Pi) for 4 and 8 days (Figure 3). Lipids were extracted and analyzed by HPLC-MS/MS. Since calli are non-photosynthetic cells, their phospholipid-to-galactolipid ratio is much higher than in leaves, making lipid remodeling defects more noticeable in calli. After 8 days of phosphate starvation, a slight but non-significant reduction in the total glycerolipid content was observed (Figure 3A), alongside phospholipid degradation and an increase in DGDG and SQDG levels (Figure 3B). In the transgenic lines, DGTS levels increased more than 100 times (Figure 3C), yet represented less than 5 % of the total glycerolipid content, even after 8 days of starvation. Similar to what we observed in leaves, DGTS synthesis had no major effect on the kinetics of lipid remodeling, except for a slight, non-significant delay in the reduction of the glycerolipid content, potentially due to the the neosynthesis of DGTS (Figure 3C).

When examining fatty acid composition and glycerolipid molecular distribution (Figure S5A), the mutant cells showed an enrichment in 18:1 fatty acid, a phenomenon observed in +Pi condition, suggesting it is independent of DGTS production. This enrichment is more likely due to differences in cell division kinetics, as previously reported (Mei *et al.*, 2015), and not to the transgene expression. This pattern was reflected in the glycerolipid composition (Figure S5C and D). In terms of DGTS composition (Figure S5B), as in leaves, DGTS molecular distribution was similar to that of PC, with a slight enrichment in 34 C species, contrasting with the DGDG composition. This suggests that DGTS is synthesized from a distinct pool of DAG than the one dedicated to extraplastidial lipid synthesis.

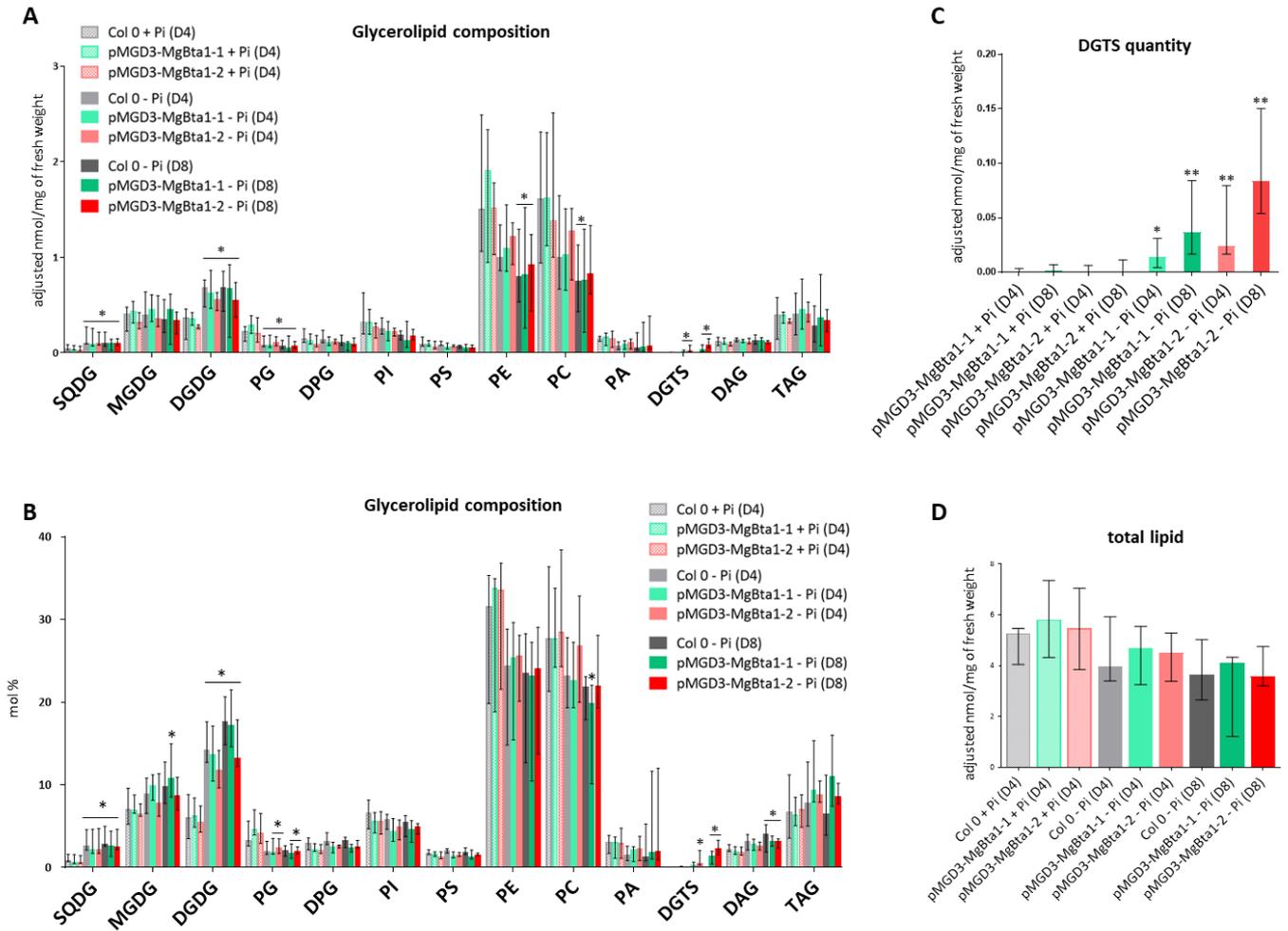


Figure 3. Lipid analysis of *pMGD3-MgBTA1* calli. (A) to (D) Lipid analysis of *pMGD3-MgBta1-1*, *pMGD3-MgBta1-2* and Col0 calli grown in phosphate replete (+Pi) and deplete (-Pi) conditions and harvested at day 4 (D4) and day 8 (D8). Represented values correspond to the median of 6 biological replicates and the error bars represent the range between minimum and maximum values. (A) Adjusted glycerolipid content per mg of fresh weight, (B) glycerolipid composition in mol %, (C) zoom on DGTS content and (D) total lipid content, all determined by HPLC-MS/MS. Asterisks indicate significant differences (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$) in comparison to +Pi (D4) condition by a Kruskal-Wallis test. SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; DPG, diphosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PA, phosphatidic acid; DGTS, ; DAG, diacylglycerol; TAG, triacylglycerol.

Analysis of DGTS overproduction in *Nicotiana benthamiana* leaves.

Given the low levels of DGTS production in our stable *A. thaliana* lines, we used the transient expression system in *N. benthamiana* described earlier to achieve significantly higher DGTS level and assess the impact on the lipidome and membrane structure of higher plants. Protein overexpression through agroinfiltration can influence leaf metabolism by inhibiting chloroplast gene expression and activating oxidative stress responses (Hamel *et al.*, 2024). To ensure that the observed leaf phenotypes were due to DGTS production and not to protein overexpression or agroinfiltration stresses, three DGTS synthases targeted to the ER with different amount of DGTS production were selected: MgBTA1, for high DGTS production, PtBTA1 for moderate production, and nf-PtBTA1 for ineffective production (Figure S1B).

The three enzymes were fused to the Sec63 transmembrane domains in N-terminus and to the GFP in C-terminus (Figure S1B). To validate their ER localization, GFP fluorescence was observed using confocal microscopy (Figure 4). For all three enzymes, the GFP signal matched the ER membrane pattern in epidermal cells, exhibiting the standard reticulated network pattern and nuclear envelope staining (Figure 4A). As variations in the GFP signal intensities were reproducibly observed between the three constructions, we quantified the level of GFP fluorescence within cells from independent agroinfiltration experiments. MgBTA1-GFP and nf-PtBTA1-GFP showed consistently higher fluorescence intensities compared to PtBTA1-GFP (at least twice as high), indicating lower expression levels of the PtBTA1-GFP enzyme (Figure 4B). These results can explain the lower DGTS production observed for PtBTA1 overexpressor in TLC analysis (Figure S2). To confirm this result, we tried to quantify the BTA1-GFP signal by Western blot. However, whatever the protein extraction methods and the protease inhibitors used, no signal corresponding to the intact protein was detected but a signal corresponding to the GFP alone was measured (Figure S6). Because the fluorescence signal is not cytosolic as expected for GFP alone *in planta*, the BTA1-GFP fusion is likely preserved *in vivo*. The intensity of the GFP band corresponded to the fluorescence levels, very high for MgBTA1-GFP and nf-PtBTA1-GFP and barely detectable for PtBTA1-GFP. To validate the ER localization, MgBTA1-GFP and nf-PtBTA1-GFP were co-expressed with an ER marker fused to RFP (Figure 4C). GFP and RFP co-localized, indicating that the constructed proteins were indeed restricted to the ER and no significant degradation of the fusion releasing GFP alone occurs *in planta*.

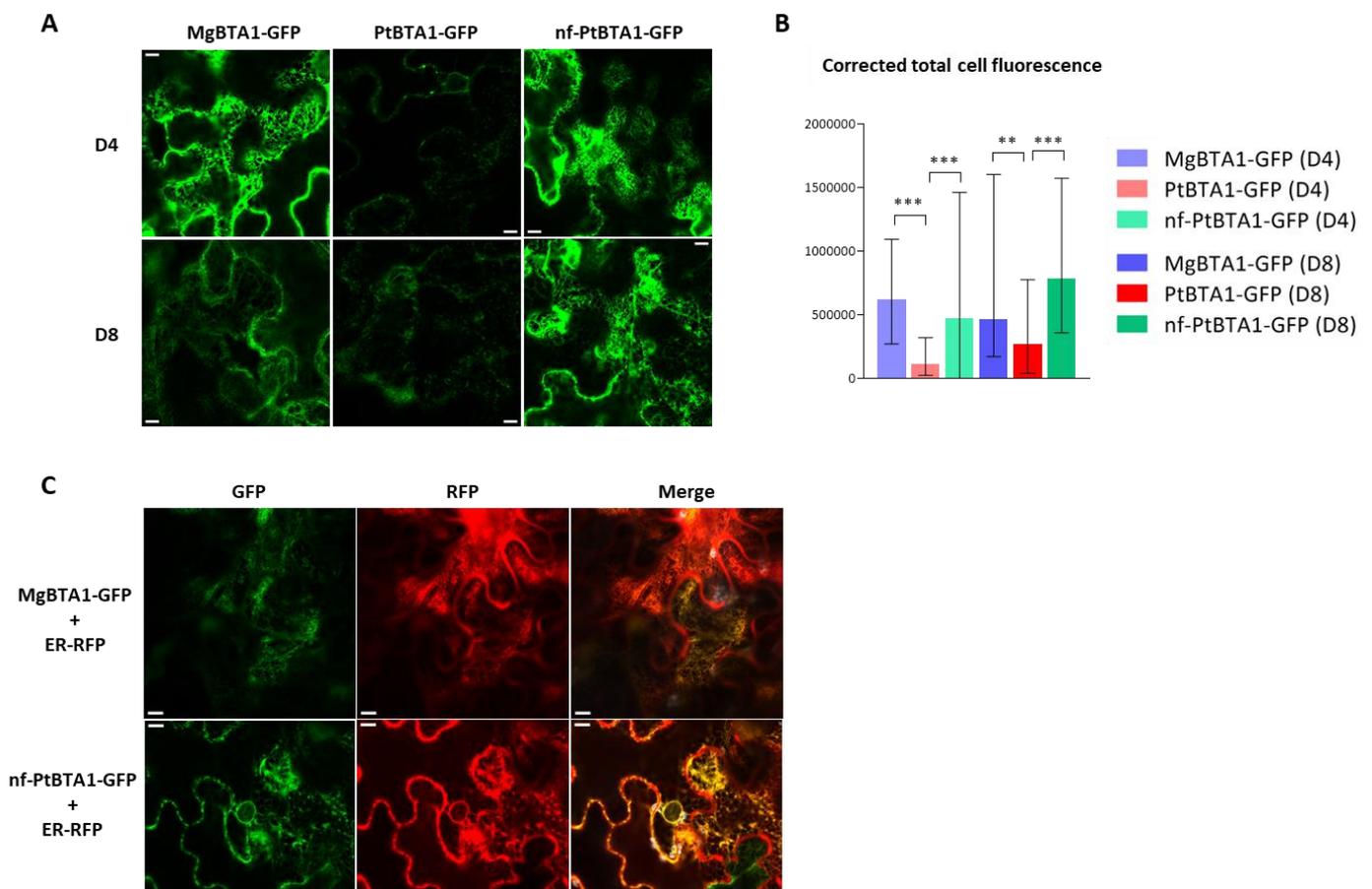


Figure 4. Subcellular localizations of BTA1 proteins overexpressed in *Nicotiana benthamiana*. (A) Subcellular localization of MgBTA1-GFP, PtBTA1-GFP and nf-PtBTA1-GFP proteins transiently expressed in *N. benthamiana* leaves 8 days after infiltration. (Scale bar, 10 μ m). (B) Fluorescence quantification from confocal images of BTA1-GFP, PtBTA1-GFP and nf-PtBTA1-GFP fused proteins transiently expressed in *N. benthamiana* leaves 8 days after infiltration. Determination of Corrected total cell fluorescence (CTCF) was done with ImageJ software with a total of 30 images per construction, taken from 3 independent plants. CTCF = Integrated Density – (Area of selected cell X Mean fluorescence of background readings). Asterisks indicate significant differences (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) in pairwise comparisons by a Kruskal-Wallis test. (C) Subcellular localization of MgBTA1-GFP and nf-PtBTA1-GFP proteins transiently co-expressed with the ER marker ER-RFP in *N. benthamiana* leaves. ER-RFP : RFP protein fused to a HDEL retention signal in C-ter. (Scale bar, 10 μ m).

Lipid analysis of leaves expressing P19 only (infiltration control), nf-PtBTA1-GFP, PtBTA1-GFP and MgBTA1-GFP fused proteins at 4 and 8 days post-nfiltration was performed using HPLC-MS/MS (Figure 5 and S7). Interestingly, nf-PtBTA1-GFP produced a small amount of DGTS, undetectable by TLC (Figure 1), suggesting that the enzyme with an extended N-terminus is not entirely inactive (Figure 5A). However, DGTS synthesis was negligible compared to leaves expressing PtBTA1-GFP and MgBTA1-GFP, despite a protein expression level similar to the one of MgBTA1 (Figure 4B). In PtBTA1 and MgBTA1 overexpressors, DGTS accumulated at a very high level, even equivalent to MGDG content at D8 in the MgBTA1 overexpressing leaves (Figure 5A and B), reflecting probably the difference of expression of the two proteins. Indeed, DGTS accounted for up to 30 mol% of the glycerolipid content in leaves overexpressing MgBTA1-GFP (Figure 5B). When looking at the DGTS molecular composition, as in Arabidopsis, DGTS molecule distribution is comparable to PC distribution, with a preference for 34 carbon DAG backbone, distinct from DGDG distribution (Figure S7A-C). This 34 carbon enrichment in DGTS can be seen at the level of the total fatty acid composition in MgBTA1 agroinfiltrated leaves with a global enrichment of 16:0 (Figure S7D).

Despite the high DGTS amount, no significant changes in global glycerolipid content were observed, except maybe for a slight non-significant increase of lipid content in MgBTA1 overexpressor (Figure 5C). Looking at the glycerolipid proportion within the leaves (Figure 5B) although the differences are non-significant, galactolipid levels appeared to be affected when DGTS production exceeded 10 % of the glycerolipid content, while SQDG remained unaffected. PA and PC levels, as well as PG at D8, also seemed to decrease in MgBTA1-overexpressing leaves, possibly to accommodate the increase in DGTS.

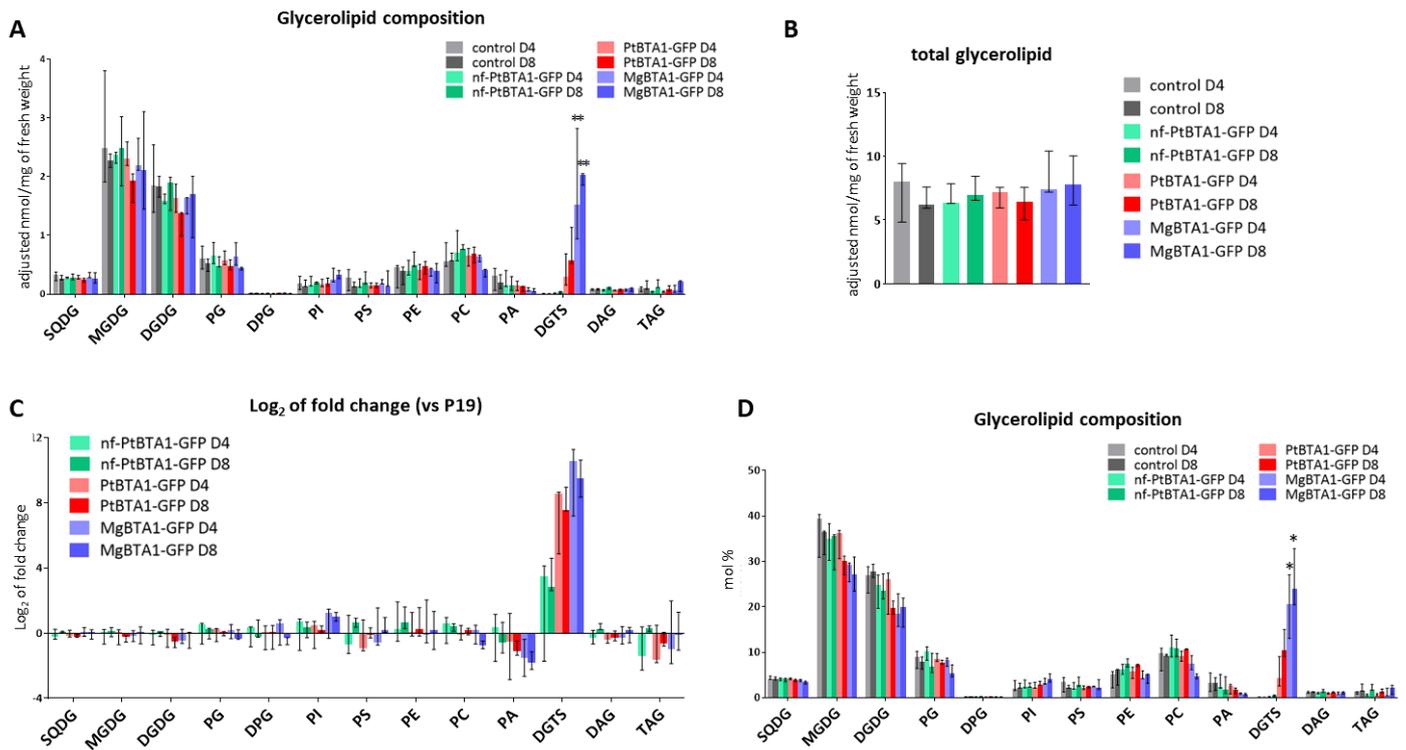


Figure 5. Lipid analysis of *Nicotiana benthamiana* leaves agroinfiltrated with BTA1 constructions. (A) to (D) Lipid analysis of *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with P19 only, nf-PtBTA1-GFP, PtBTA1-GFP and MgBTA1-GFP fused proteins. Leaves were harvested 4 (D4) and 8 (D8) days after agroinfiltration. Control: *N. benthamiana* agroinfiltrated with P19 protein (negative control). Each replicate corresponds to two leaves that were pooled. Represented values correspond to the median of 3 biological replicates and the error bars represent the range between minimum and maximum values. Asterisks indicate significant differences (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$) in comparison to control D4 and D8 by a Kruskal-Wallis test. **(A)** Quantity of each class of glycerolipids determined by HPLC-MS/MS. **(B)** Total glycerolipid quantity determined by HPLC-MS/MS. **(C)** Log₂ fold change in lipid quantities between BTA1 constructions (nf-PtBTA1-GFP, PtBTA1-GFP and MgBTA1-GFP) and P19. **(D)** Glycerolipid distribution. SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; DPG, diphosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PA, phosphatidic acid; DGTS, ; DAG, diacylglycerol; TAG, triacylglycerol.

Given the high DGTS production in the MgBTA1 overexpressing leaves and the minimal impact on other glycerolipids, we investigated the subcellular localization of DGTS, particularly regarding chloroplast membranes, representing more than 70 % of the cell membranes. Chloroplast were purified from D4 agroinfiltrated leaves with nf-PtBTA1-GFP, as a control with a high amount of protein overexpression and a poor level of DGTS production, or with MgBTA1-GFP leaves, that contain more than 20 % of DGTS (Figure 6A and B). Chloroplast fractions were characterized by a high proportion of glycolipids and a very low amount of PE and PC in comparison to the total fractions whereas the opposite is true for the endomembrane fractions. The chloroplast fractions for both overexpressors were pure, with an enrichment of LHCP (thylakoid marker) and no labelling of BIP2 (ER marker) and GFP (BTA1 marker) (Figure 6C). In these fractions, DGTS was detected at the same low level (<1.5 %) in nf-PtBTA1 and MgBTA1 agroinfiltrated leaves (Figure 6B). The extraplastidial fractions are contaminated by chloroplast with a high amount of galactolipid and the presence of LHCP, however they are

enriched in endomembranes with a strong BIP2 signal and an enrichment in PE absent from chloroplast membranes. These fractions contain roughly the same amount of DGTS than the total extracts. Overall, this experiment indicates that DGTS is absent from the chloroplast membranes and restricted to extraplastidial membranes, highlighting the specificity of lipid transport pathway towards chloroplasts.

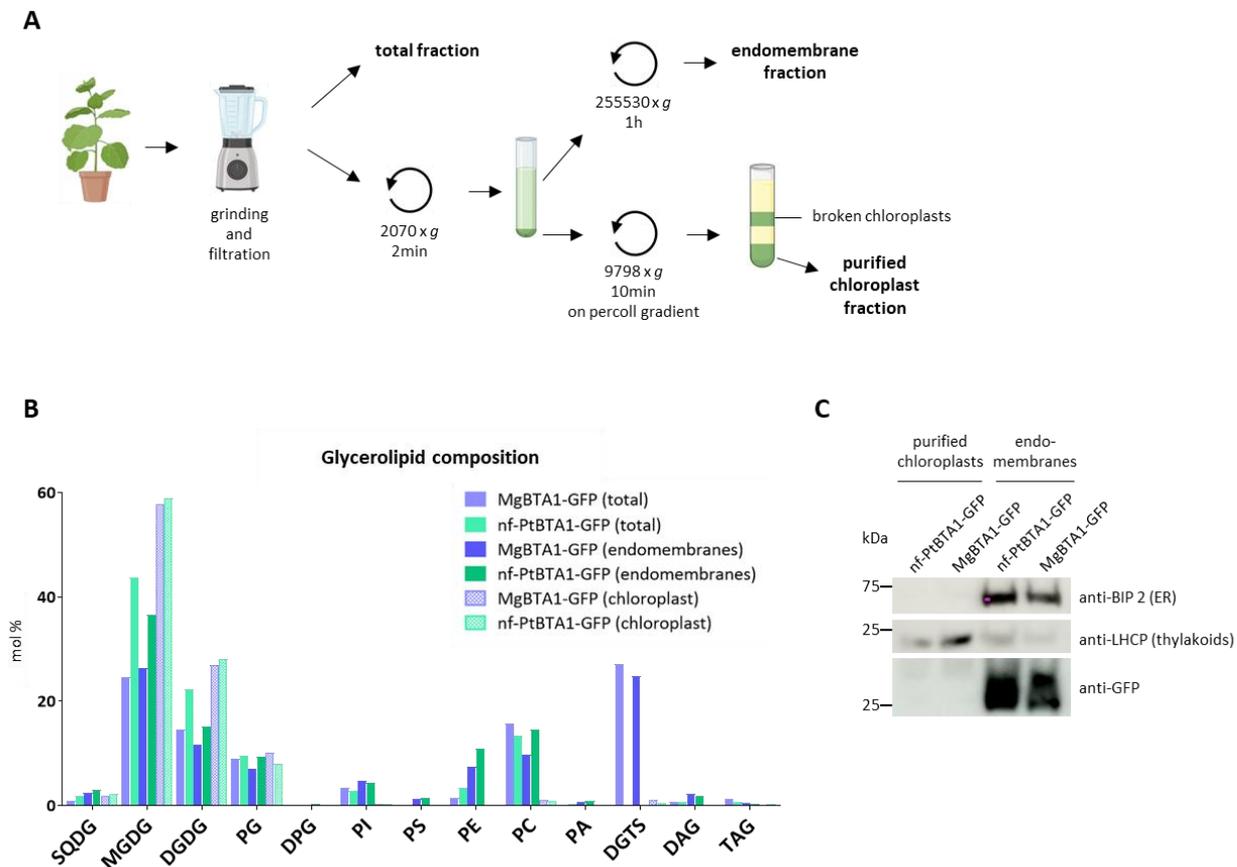


Figure 6. Localization of DGTS in *Nicotiana benthamiana* leaves overexpressing either MgBTA1-GFP or nf-PtBTA1-GFP. (A) Strategy used to isolate chloroplast and extraplastidial fractions from 3 to 4 g of *N. benthamiana* leaves (representing 8 different plants with 2 leaves per plant independently infiltrated) 4 days after agroinfiltration with BTA1Mg-GFP and nf-BTA1Pt-GFP fused proteins. Curved arrows represent the centrifugation steps. **(B)** Proportion of glycerolipids determined by HPLC-MS/MS in each fraction. Total, total fraction; extraplast mb, extraplastidial membrane fraction; chloroplast, purified chloroplast fraction. **(C)** Western blot analysis of purified chloroplast and extraplastidial membrane fractions using BIP2 antibody for ER, LHCP for thylakoids and GFP for BTA1 fused proteins.

To assess the impact of DGTS accumulation on extraplastidial membranes, leaves agroinfiltrated at D4 with P19, nf-PtBTA1-GFP, PtBTA1-GFP and MgBTA1-GFP were observed by electronic microscopy (**Figure 7A and S8**). Chloroplast and thylakoid ultrastructure appeared unaffected, except maybe for an increase in starch content in MgBTA1 overexpressors (**Figure 7A, first lane**). To validate if it was not an artefact of observation, starch content was measured in different leaf extracts from different independent plants and leaves. The starch content was highly variable depending on the experiment and seems to correlate more with the level of protein overexpression than with DGTS production, nf-PtBTA1 and MgBTA1 having the highest level of protein expression and starch content with very different DGTS amounts (**Figure S9A**). Photosynthesis efficiency was also measured (**Figure S9B and C**). As expected, agroinfiltration has a negative impact on the electron transfer rate (ETR) and

maybe a slight delay on the relaxation time of the non photochemical quenching (NPQ) (Hamel *et al.*, 2024). No difference was observed between P19 and the BTA1 overexpressors in terms of NPQ. However, the ETR seemed to be slightly related to the DGTS amount with an ETR value following the DGTS proportion: $ETR_{MgBTA1} \leq ETR_{PtBTA1} \leq ETR_{nf-PtBTA1}$ and ETR_{P19} . Further investigations would be needed to confirm if this finding is related to the observed galactolipid reduction.

In the MgBTA1 overexpressors, membrane proliferations were observed in the cytosol possibly related to the extraplasmidial localization of DGTS (Figure 7A and S8). These structure were absent in the leaves overexpressing nf-PtBTA1, indicating a link to DGTS production rather than protein overexpression. The architecture of these membrane structures was analyzed in 3D by Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) in comparison with what could be observed in nf-PtBTA1 overexpressor (Supplemental movie 1 and 2). A snapshot of the reconstituted cell architecture showing the cell wall, the mitochondria, the peroxisome and the ER without the plastid is presented Figure 7B. In both case, ER is surrounding mitochondria and peroxisomes that are embedded within ER tubules. Furthermore, reconstructed ER from MgBTA1-GFP overexpressor is constituted of numerous tubule layers but with a membrane organization very similar to the standard ER architecture observed in nf-PtBTA1 overexpressor (Figure 7C). In reference to the cell wall volume, the volume of the ER in MgBTA1-GFP overexpressor is 8 times greater than the volume of the ER in nf-PtBTA1-GFP overexpressor. Overall, these results indicate that DGTS is probably synthesized in the ER and its accumulation stimulates ER proliferation at the expense of the other membranes.

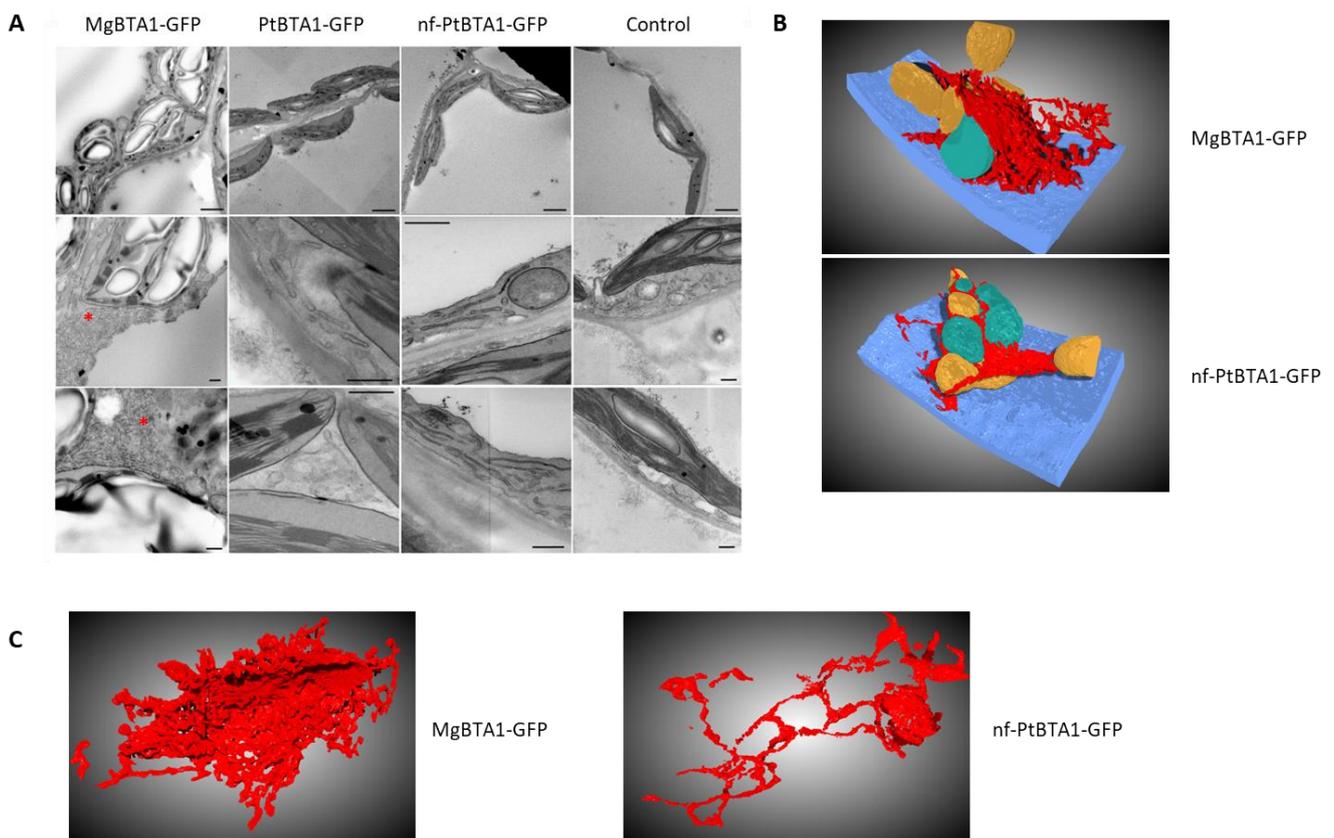


Figure 7. Impact of BTA1 proteins transient expression on *Nicotiana benthamiana* leaves cell architecture (A) Electronic microscopy observation of the architecture of cellular membranes in *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with BTA1 fused proteins (nf-PtBTA1-GFP, PtBTA1-GFP and MgBTA1-GFP) or P19 as control at day 4. The scale bar is 2 μm for the top four images and 500 nm for the rest of the images. Red asterisks indicate membrane ER proliferation. **(B)** and **(C)** Representative 3D architecture of the cell **(B)** and the ER alone **(C)** from FIB-SEM imaging from *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with MgBTA1-GFP or nf-PtBTA1-GFP. In blue, the cell wall; in red, the ER; in yellow, the mitochondria and in green the peroxisomes. These pictures are extracted respectively from the supplementary movies 1 for MgBTA1-GFP and 2 for nf-PtBTA1-GFP.

Discussion

Betaine lipids are absent in seed plants but can be found in chlorophytes up to ferns (Vogel and Eichenberger, 1992; Rozentsvet, 2004). Since the identification of the genes responsible for DGTS synthesis (Riekhof *et al.*, 2005a,b), genome analyses and phylogenetic reconstructions have confirmed the absence of the BTA1 gene in seed plants- gymnosperms and angiosperms- and have linked its evolution to the habitat, whether freshwater or marine environment (Bolik *et al.*, 2023). By expressing BTA1 genes derived from marine or freshwater organisms in *Nicotiana benthamiana* (Figure 1), we demonstrated that plants retain the ability to produce DGTS and that the absence of the BTA1 gene is solely responsible for the loss of their capacity to synthesize DGTS. However, in our hands, we never managed to obtain stable *Arabidopsis thaliana* lines that overexpress DGTS under the control of the constitutive 35S promoter. Previous studies have indicated that DGTS bilayers are thicker than PC bilayers and that the DGTS bilayer thickness could be sensitive to hydration (Bolik *et al.*, 2023). Seed plants lost their desiccation tolerance at the vegetative stage compared to more primitive plant and produced seeds representing a very dry stage (less than 20 % of protoplasmic water) (Oliver *et al.*, 2000). The disappearance of the BTA1 gene coincides with these two parameters. Further experiments are needed to determine whether this is a mere correlation or a causal relationship.

Betaine lipids are known to substitute for extraplastidial phospholipids in various organisms, such as bacteria, fungi and algae under phosphate starvation (Van Mooy *et al.*, 2009; Riekhof *et al.*, 2014; Abida *et al.*, 2015; Mühlroth *et al.*, 2017; Murakami *et al.*, 2018; Oishi *et al.*, 2022). In seed plants, however, this function is performed by DGDG, which is synthesized in plastids and exported outside of the chloroplast (Jouhet *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2005). To investigate this remodeling, we stably expressed the MgBTA1 gene in *Arabidopsis thaliana* under the control of a phosphate starvation inducible promoter, pMGD3 (Shimojima *et al.*, 2015). Under phosphate starvation, DGTS was synthesized at very low levels in vegetative tissues without affecting plant growth or lipid remodeling. The DGDG content increased, and phospholipid degradation was similar to the wild type plants. The level of DGTS production remained low, representing less than 5 % of total glycerolipids. The pMGD3 promoter has been shown to be induced more than 10-fold under phosphate starvation compared to control condition (Shimojima *et al.*, 2015) whereas the 35S promoter is known to induce gene expression more than 100 fold for the same genes (Demski *et al.*, 2020). This difference in promoter strength likely explains the low DGTS production.

DGTS synthesis occurs in two steps: the first one uses DAG and SAM as substrates to produce diacylglycerol-*O*-homoserine which then undergoes successive methylation steps from the SAM donor to form DGTS (Riekhof *et al.*, 2005*a,b*). During phosphate starvation, DAG is supposed to be released from PC for recycling into DGDG (Jouhet *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2009); however, the exact localization of DAG release remains unknown. In our experiments, DGTS production under phosphate starvation did not impact DGDG synthesis or its molecular composition (Figure 2, 3 and S5). We hypothesize that DAG released from PC degradation for DGDG synthesis is therefore not accessible to BTA1 enzyme, possibly because the process does not occur in the ER or because DAG is never freely available and directly channeled to chloroplast outer membrane for DGDG synthesis. Nevertheless, the low level of DGTS obtained, even after 8 days of starvation, could explain the absence of phenotypes in our stable lines and the use of a promoter with a higher expression level is required to conclusively determine the role of DGTS in lipid remodeling and plant acclimation to phosphate starvation.

In *N. benthamiana* leaves, using the 35S promoter, DGTS accumulated up to 20% of total glycerolipids, slightly reducing the production of galactolipids, PC and PA (Figure 5). However, the molecular distribution of these lipid classes remained unchanged (Figure S7), indicating that even high levels of DGTS do not affect the eukaryotic pathway in galactolipid synthesis (Petroutsos *et al.*, 2014) and therefore do not interfere with the recycling of DAG backbones coming from PC into galactolipids. This suggests that DGTS synthesis likely occurs more from DAG *de novo* synthesis, via the Kennedy pathway rather than being derived from the PC backbone (Zhou *et al.*, 2020). If this hypothesis is correct, it implies that fatty acid desaturases can act on DGTS as they do on PC. In *C. reinhardtii*, which lacks PC, fatty acid desaturases act on DGTS (Li-Beisson *et al.*, 2015), and CrFAD2 sequence is homologous to AtFAD2 sequence (Chi *et al.*, 2008), making this hypothesis plausible and suggesting that the ability to desaturate DGTS has not been lost through the evolution. Additionally, a very high amount of DGTS slightly stimulates fatty acid production, with an enrichment in 16:0 fatty acid (Figure S7D). This is consistent with DGTS being enriched in DAG backbones with 34 carbons - i.e. 16:0/18:X compared to the PC composition, which could be related to a “pull” effect (Vanhercke *et al.*, 2019) generated by the consumption of *de novo* DAG by BTA1 that will drag indirectly fatty acid synthesis. Another possibility for DGTS accumulation would be a “protect” effect (Vanhercke *et al.*, 2019) resulting from the loss of lipases capable of degrading betaine lipids during evolution. Lipases that act on betaine lipids to produce DAG have not yet been identified (Hoffmann and Shachar-Hill, 2023) and since phospholipase D and C act on the phosphate moiety absent in betaine lipids, they are not expected to be active on this lipid class.

The BTA1 gene was targeted to the ER with the Sec63 transmembrane fragment to mimic the localization observed in algae and fungi (Künzler *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2016). In our experiments, BTA1 localized in the ER and DGTS accumulation induced an ER proliferation without altering its structure. This feature suggests that DGTS can indeed fulfill a structural role similar to phospholipids, at least in well-watered leaves. Producing inducible line with hormone treatments such as dexamethasone would be a useful tool to investigate the sensitivity of DGTS overexpressing plants to drought and to study the *in vivo* dehydration effect on ER membrane enriched in DGTS. The ER proliferation and the absence of DGTS in purified chloroplast fractions indicate that

DGTS is produced in the ER and not transported to the chloroplasts. This confirms the selective nature of lipid trafficking from the ER to chloroplast membranes, as it was previously shown that PC was able to be transferred from liposomes to chloroplasts, but not PE (Yin *et al.*, 2015). The transfer of DGTS to other endomembranes could occur through vesicular trafficking, but this needs to be further investigated, as well as a potential mitochondria transfer. In *C. reinhardtii* and *Saccharomyces cerevisiae* (Riekhof *et al.*, 2014; Li-Beisson *et al.*, 2015), DGTS replaces PC in all membranes suggesting that DGTS could be present in all extraplastidial membranes.

In conclusion, DGTS can be synthesized in seed plant leaves and calli through overexpression of the Bta1 gene. The DGTS synthesis pathway appears to compete with PC synthesis *via* the Kennedy pathway but does not seem to derive from PC diacylglycerol backbone recycling, thus not interfering with the eukaryotic pathway involved in galactolipid synthesis. DGTS accumulation induces ER membrane proliferation, confirming the restricted localization of DGTS to endomembranes, and possibly mitochondria, while being absent from chloroplast membranes. The utilization of ER-produced DAG as a substrate by BTA1, without affecting galactolipid composition, highlights our limited understanding of the mechanisms and the nature of the lipid molecules transported to the chloroplast for galactolipid synthesis (Kalisch *et al.*, 2016; Karki *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020). Finally, the impact of DGTS production should now be investigated under drought condition or in seed tissue to determine if hydration is indeed a key factor in explaining the loss of DGTS in seed plants.

Supplementary Files

Supplementary data 1: Optimized sequences of BTA1 gene for plant expression.

Supplementary movie 1: FIB-SEM imaging from *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with MgBTA1-GFP.

Supplementary movie 2: FIB-SEM imaging from *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with nf-PtBTA1-GFP.

Supplementary figures S1 to S9

Funding Statement

Sarah Salomon is supported by an INRAE PhD fellowship. Juliette Jouhet is supported by the Blink ANR (ANR-18-CE92-0015). The LIPANG (Lipid analysis in Grenoble) platform is supported by the Rhône-Alpes Region, the fonds FEDER, and GRAL, financed within the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003). We thank the microscopy facility MuLife of IRIG/DBSCI, funded by CEA Nanobio and GRAL LabEX (ANR-10-LABX-49-01) financed within the University Grenoble Alpes graduate school CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

Acknowledgements

The authors would like to thank Sylvie Figuet for the maintenance of the plant growth facility and Dimitri Tolleter for his help for the photosynthesis measurement.

Author Contribution

Sarah Salomon generated the cloning, the plant material and realized most of the experiments, Marion Schilling did the lipid analysis, Sylvaine Roy developed the softwares for reprocessing GC-FID and LC-MS data, Catherine

Albrieux realized the chloroplast purification, Gregory Si Larbi, Denis Falconet and Pierre-Henri Jouneau achieved the electronic microscopy experiments, Morgane Michaud conceived the BTA1 expression in ER, the cloning strategy and stable transgenic *A. thaliana* lines, Juliette Jouhet designed and supervised the work and wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest

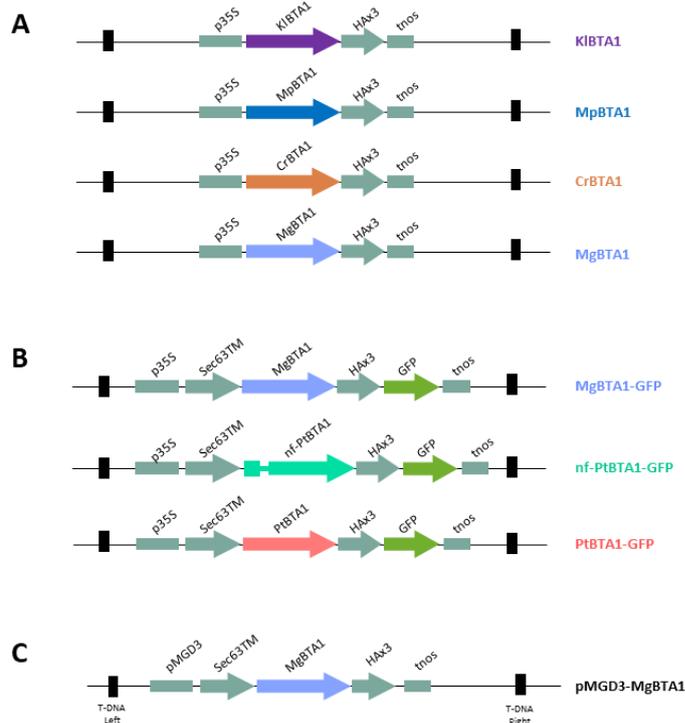


Figure S1. Genetic constructions used for plant transformations

(A) Schematic representation of constructions used for *N. benthamiana* transient transformations and subsequent TLC analysis for BTA1 activity shown in Fig 1. p35S : Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. PtBTA1 : *BTA1* gene of *P. tricornutum* (Phatr3_J42872). nf-PtBTA1 : non-functional BTA1Pt protein containing an intron at the N-terminus of the protein. MgBTA1 : *BTA1* gene of *M. gaditana* (Naga_100016g36). KIBTA1, MpBTA1 and CrBTA1 correspond to the *BTA1* gene from *Kluyveromyces lactis*, *Marchantia polymorpha* and *Chlamydomonas reinhardtii*, respectively.

(B) Schematic representation of constructions used for *N. benthamiana* transient transformations and subsequent analyses (lipid analyses, microscopy, chloroplast purification, western blot, starch quantification and photosynthesis analyses). GFP : Green Fluorescent Protein.

(C) Schematic representation of the construction used for *A. thaliana* stable transformation. pMGD3 : MGD3 promoter inducible by Pi starvation. Sec63TM : transmembrane fragment of Sec63 protein (targeting sequence to ER). tnos : nopaline synthase terminator.

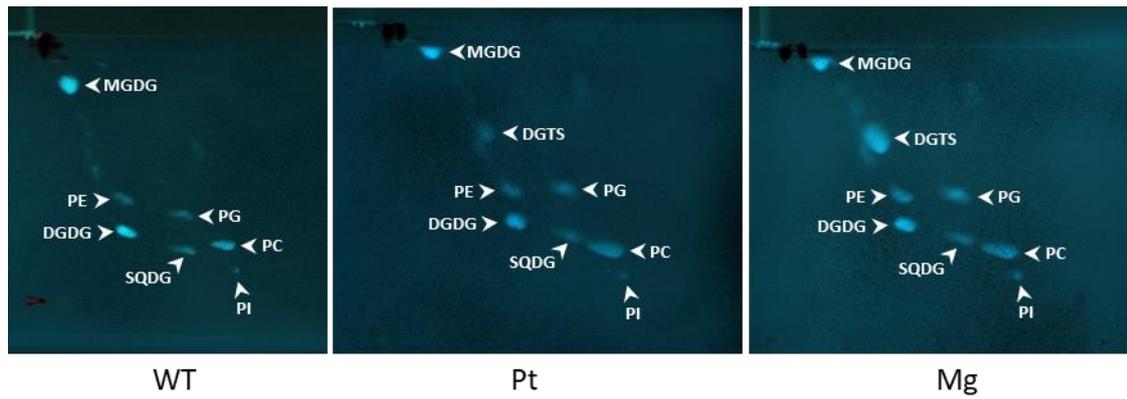


Figure S2. 2DTLC analysis of lipid extract of *Nicotiana Benthamiana* leaves expressing *Bta1* genes from *Phaeodactylum tricornutum* (Pt) and *Microchloropsis gaditana* (Mg). WT : *Nicotiana benthamiana* leaves agroinfiltrated with P19 only. SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; DGTS, diacylglycerol-N,N,N-trimethyl-homoserine.

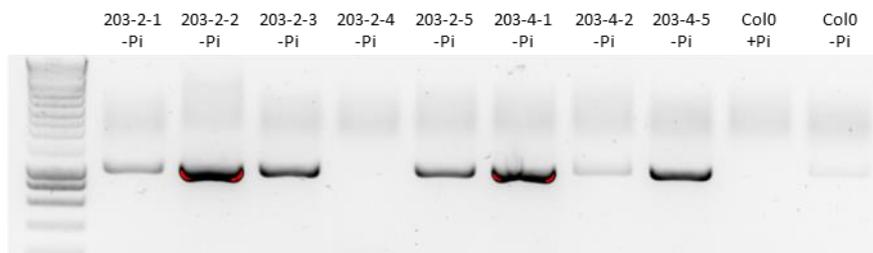


Figure S3. Screening of pMGD3-BTA1Mg-HA seedlings

PCR on *MgBTA1* gene (Naga_100016g36) performed on F2 seedlings lines grown in liquid MS medium depleted (-Pi) or repleted (-Pi) with Pi for Col0. Seedlings were harvested after 9 days of culture. 203-2-5 and 203-4-1 lines were kept and renamed pMGD3-MgBTA1-1 and pMGD3-MgBTA1-2, respectively.

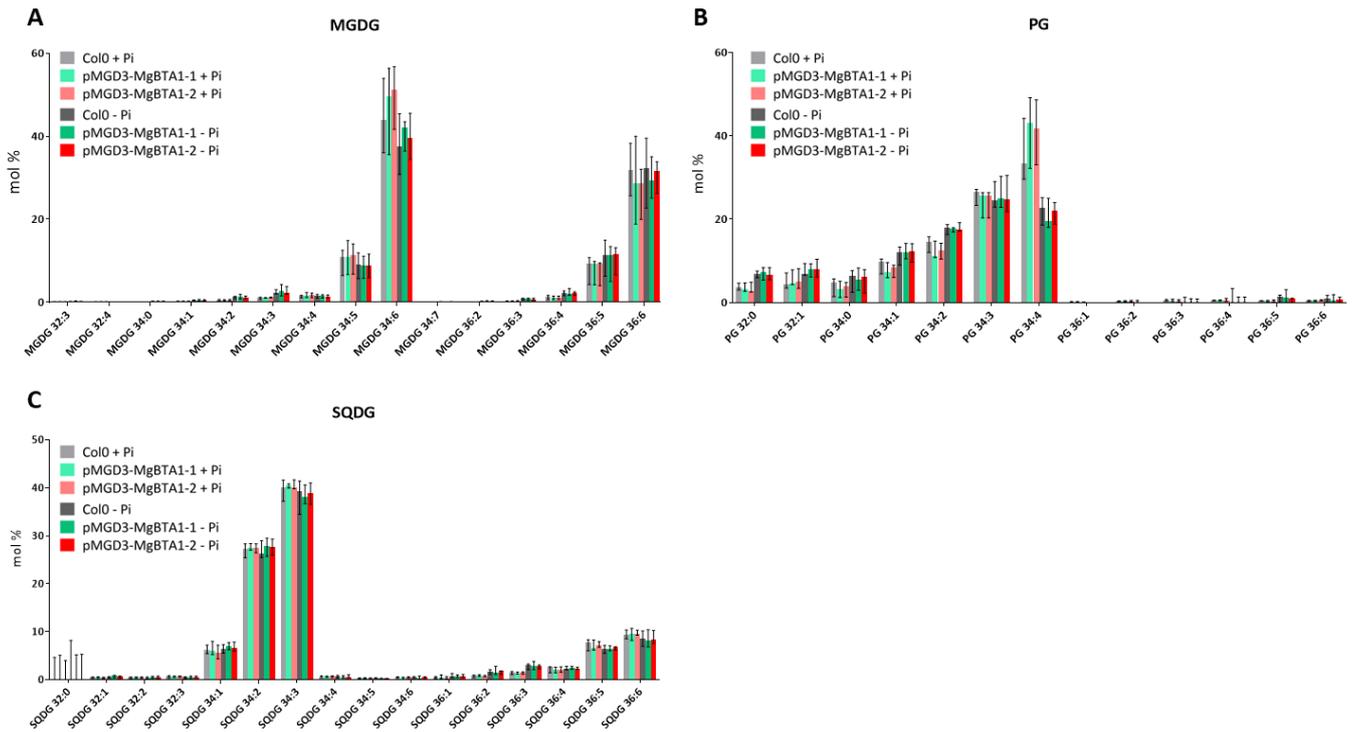


Figure S4. Molecular distribution within MGDG (A), PG (B) and SQDG (C) classes determined by HPLC-MS/MS of *A. thaliana* seedlings. The first number corresponds to the sum of the carbon numbers of the two fatty acids, and the second number to the number of unsaturations.

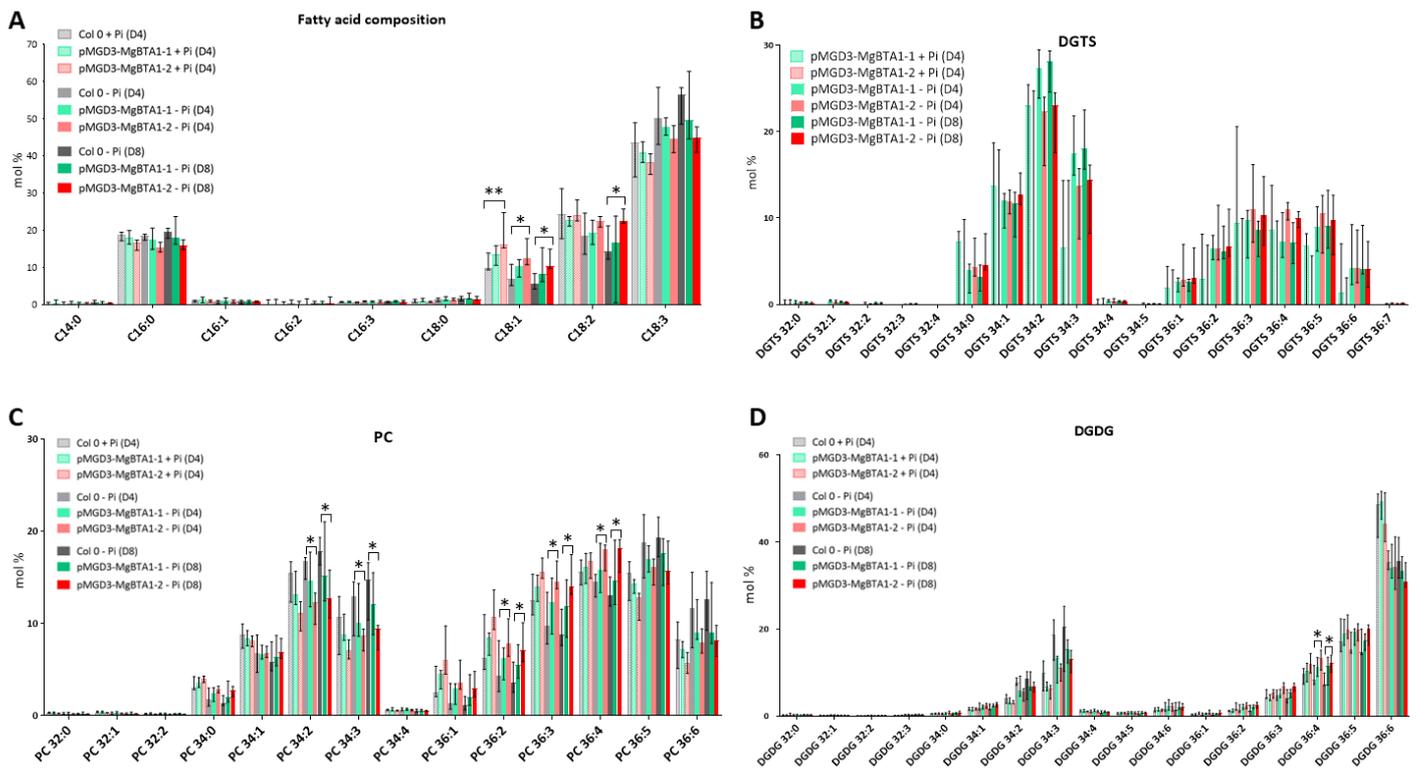


Figure S5: Lipid analysis of *A. thaliana* calli. (A) Fatty acid distribution determined by GC-FID and (B), (C), (D) molecular distribution within DGTS, PC and DGDG classes respectively determined by HPLC-MS/MS. Asterisks indicate significant differences (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$) in pairwise comparisons by a Kruskal-Wallis test. DGDG, digalactosyldiacylglycerol; PC, phosphatidylcholine; DGTS, diacylglyceryl-N,N,N-trimethyl-homoserine. The first number corresponds to the sum of the carbon numbers of the two fatty acids, and the second number to the number of unsaturations.

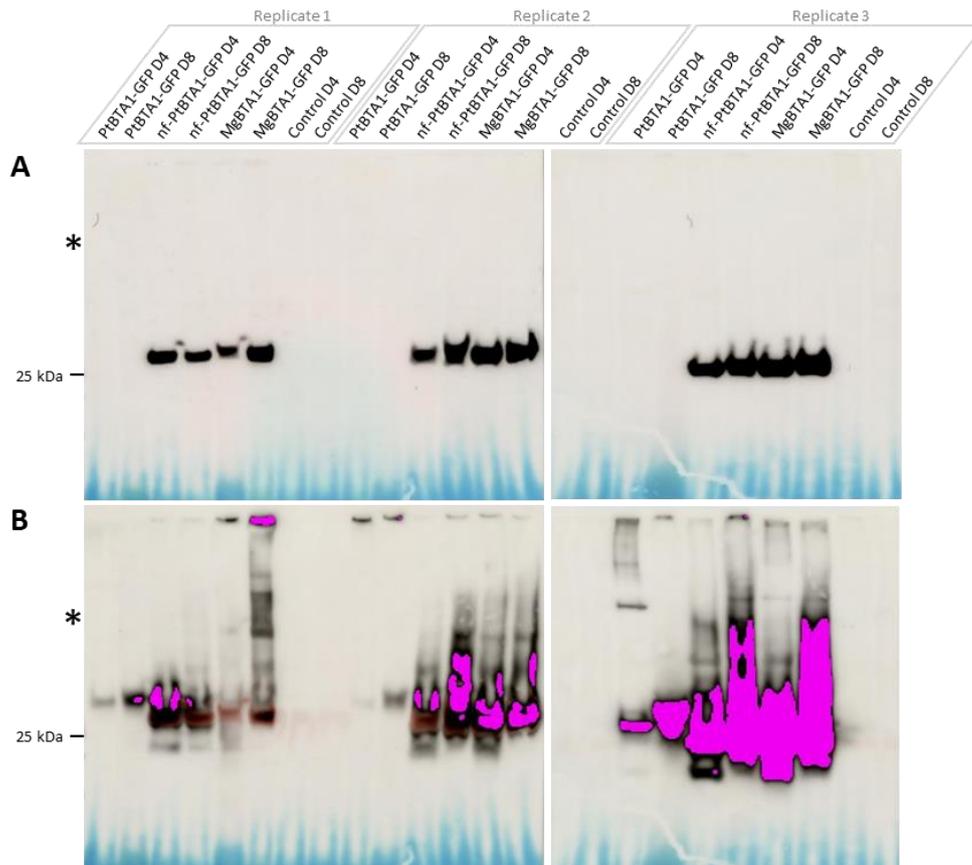


Figure S6 Western Blot analysis of agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves

Western blot analysis of *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with BTA1 fused proteins (nf-BTA1Pt-GFP, BTA1Pt-GFP and BTA1Mg-GFP) and P19 using GFP antibody. Leaves were harvested 4 (D4) and 8 (D8) days after agroinfiltration. Asterisks indicate the expected size of the fused proteins (around 110 kDa). (A) Automatic exposure. (B) Exposure of 2 minutes and 20 seconds.

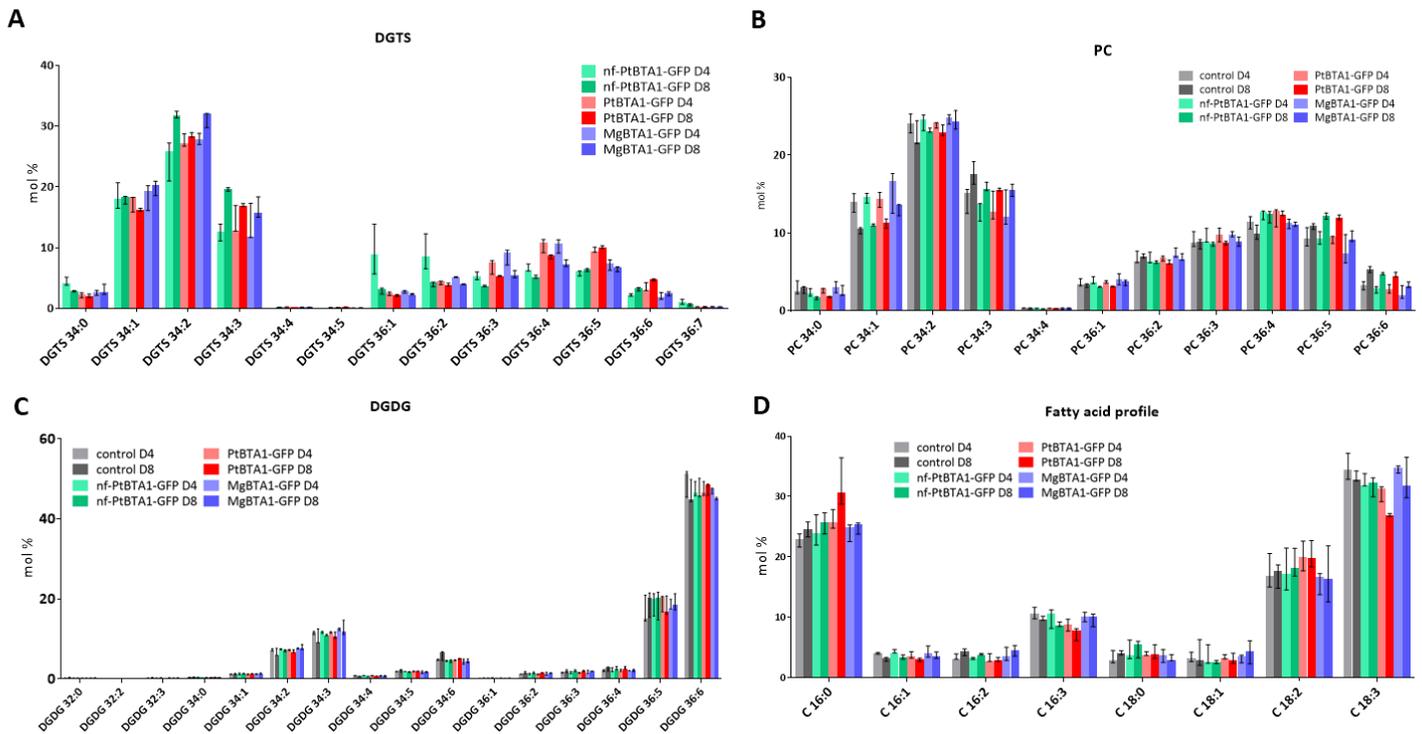


Figure S7: Glycerolipid distribution of *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with BTA1 constructions.

(A) to (C) Glycerolipid analysis and (D) fatty acid distribution of *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with P19 only (Control), nf-PtBTA1-GFP, PtBTA1-GFP and MgBTA1-GFP fused proteins. Leaves were harvested 4 (D4) and 8 (D8) days after agroinfiltration. Control: *N. benthamiana* agroinfiltrated with P19 protein (negative control). Represented values correspond to the median of 3 biological replicates and the error bars represent the range between minimum and maximum values. Molecular distribution within DGTS (A), PC (B) and DGDG (C). The first number corresponds to the sum of the carbon numbers of the two fatty acids, and the second number to the number of unsaturations. DGDG, digalactosyldiacylglycerol; PC, phosphatidylcholine; DGTS, diacylglycerol-N,N,N-trimethyl-homoserine.

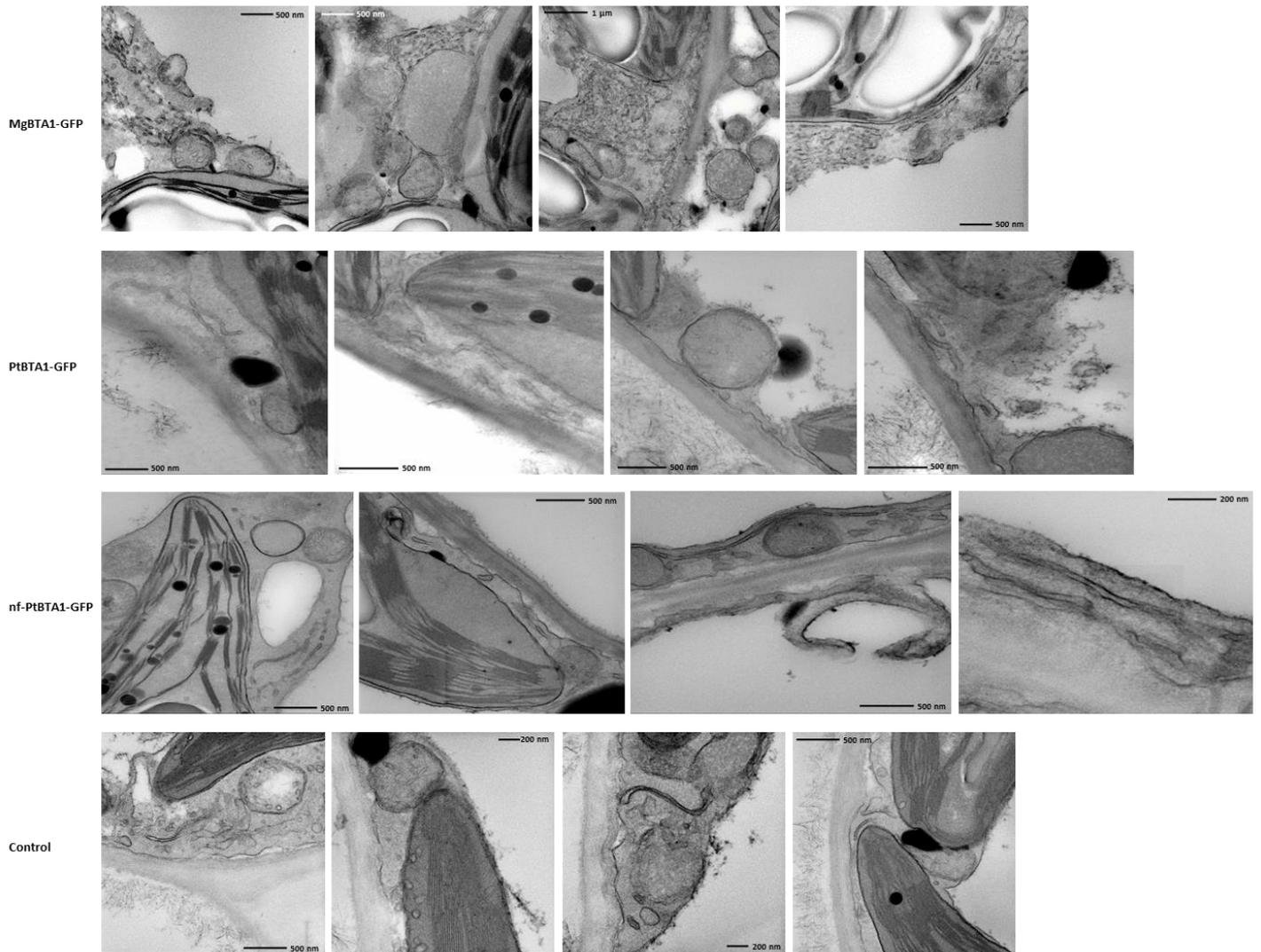


Figure S8. Electronic microscopy observation of the architecture of cellular membranes in *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with BTA1 fused proteins (nf-PtBTA1-GFP, PtBTA1-GFP and MgBTA1-GFP) or P19 as control at day 4.

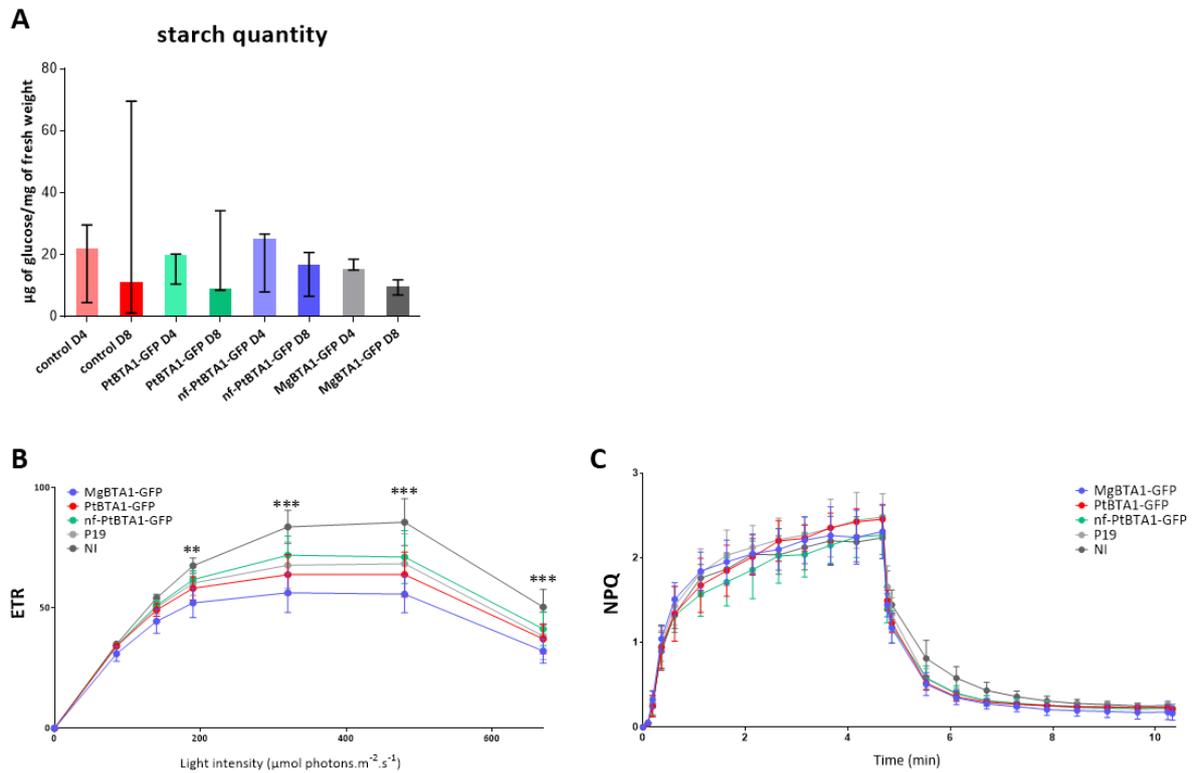


Figure S9: Photosynthesis efficiency analysis on *N. benthamiana* leaves 4 days after agroinfiltration with BTA1 constructions (MgBTA1-GFP, PtBTA1-GFP, nf-PtBTA1-GFP, P19). NI : non infiltrated. P19 : *N. benthamiana* agroinfiltrated with P19 protein (negative control). Data are expressed as average values \pm SD (bars) of three independent experiments.

(A) Starch quantification from *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with BTA1 constructions, 4 (D4) and 8 (D8) days after agroinfiltration.

(B) The Electron Transport Rate (ETR) has been calculated as $0.5 \times \text{PAR} \times \Phi_{\text{PSII}}$ where 0.5 correspond to the average ratio of PSII reaction centers to PSI reaction centers and PAR is the irradiation light level in the PAR range (400nm to 700nm) in $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Asteriks indicate significant differences (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) between MgBTA1-GFP and P19 samples by a Two-Way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test.

(C) Nonphotochemical quenching (NPQ) was calculated as $(F_m - F_m')/F_m'$. NPQ was recorded during 5 min of illumination at $672 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ followed by 5 min of darkness.

Reference

- Abida H, Dolch L-J, Meï C, et al.** 2015. Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology* **167**, 118–136.
- Andersson MX, Larsson KE, Tjellström H, Liljenberg C, Sandelius AS.** 2005. Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 27578–27586.
- Billey E, Magneschi L, Leterme S, et al.** 2021. Characterization of the *Bubblemum* acyl-CoA synthetase of *Microchloropsis gaditana*. *Plant Physiology* **185**, 815–835.
- Bolik S, Albrieux C, Schneck E, Demé B, Jouhet J.** 2022. Sulfoquinovosyldiacylglycerol and phosphatidylglycerol bilayers share biophysical properties and are good mutual substitutes in photosynthetic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1864**, 184037.
- Bolik S, Schlaich A, Mukhina T, Amato A, Bastien O, Schneck E, Demé B, Jouhet J.** 2023. Lipid bilayer properties potentially contributed to the evolutionary disappearance of betaine lipids in seed plants. *BMC Biology* **21**, 275.
- Buseman CM, Tamura P, Sparks AA, et al.** 2006. Wounding Stimulates the Accumulation of Glycerolipids Containing Oxophytodienoic Acid and Dinor-Oxophytodienoic Acid in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiology* **142**, 28–39.
- Cañavate JP, Armada I, Hachero-Cruzado I.** 2017. Interspecific variability in phosphorus-induced lipid remodelling among marine eukaryotic phytoplankton. *New Phytologist* **213**, 700–713.
- Cañavate JP, Armada I, Ríos JL, Hachero-Cruzado I.** 2016. Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* **124**, 68–78.
- Chi X, Zhang X, Guan X, Ding L, Li Y, Wang M, Lin H, Qin S.** 2008. Fatty acid biosynthesis in eukaryotic photosynthetic microalgae: Identification of a microsomal delta 12 desaturase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Microbiology* **46**, 189–201.
- Cuyas L, David P, de Craieye D, et al.** 2023. Identification and interest of molecular markers to monitor plant Pi status. *BMC Plant Biology* **23**, 401.
- Dembitsky VM.** 1996. Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology. *Progress in Lipid Research* **35**, 1–51.
- Demé B, Cataye C, Block MA, Maréchal E, Jouhet J.** 2014. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *The FASEB Journal* **28**, 3373–3383.
- Demski K, Łosiewska A, Jasieniecka-Gazarkiewicz K, Klińska S, Banaś A.** 2020. Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase1 Overexpression Delays Senescence and Enhances Post-heat and Cold Exposure Fitness. *Frontiers in Plant Science* **11**.
- Eichenberger W, Araki S, Müller DG.** 1993. Betaine lipids and phospholipids in brown algae. *Phytochemistry* **34**, 1323–1333.
- Flori S, Jouneau P-H, Gallet B, Estrozi LF, Moriscot C, Schoehn G, Finazzi G, Falconet D.** 2018. Imaging Plastids in 2D and 3D: Confocal and Electron Microscopy. In: Maréchal E, ed. *Plastids: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US, 113–122.
- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO.** 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**, 343–345.

- Hamel L-P, Tardif R, Poirier-Gravel F, et al.** 2024. Molecular responses of agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves expressing suppressor of silencing P19 and influenza virus-like particles. *Plant Biotechnology Journal* **22**, 1078–1100.
- Hoffmann DY, Shachar-Hill Y.** 2023. Do betaine lipids replace phosphatidylcholine as fatty acid editing hubs in microalgae? *Frontiers in Plant Science* **14**, 1077347.
- Hözl G, Dörmann P.** 2019. Chloroplast Lipids and Their Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **70**, 51–81.
- Jouhet J, Lupette J, Clerc O, Magneschi L, Bedhomme M, Collin S, Roy S, Maréchal E, Rébeillé F.** 2017. LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: Consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. *PLOS ONE* **12**, e0182423.
- Jouhet J, Maréchal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA.** 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *The Journal of Cell Biology* **167**, 863–874.
- Jouhet J, Maréchal E, Bligny R, Joyard J, Block MA.** 2003. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Letters* **544**, 63–68.
- Kalisch B, Dörmann P, Hözl G.** 2016. DGDG and Glycolipids in Plants and Algae. In: Nakamura Y, Li-Beisson Y, eds. *Lipids in Plant and Algae Development*. Cham: Springer International Publishing, 51–83.
- Kanduč M, Schlaich A, de Vries AH, Jouhet J, Maréchal E, Demé B, Netz RR, Schneck E.** 2017. Tight cohesion between glycolipid membranes results from balanced water-headgroup interactions. *Nature Communications* **8**, 14899.
- Karki N, Johnson BS, Bates PD.** 2019. Metabolically Distinct Pools of Phosphatidylcholine Are Involved in Trafficking of Fatty Acids out of and into the Chloroplast for Membrane Production. *The Plant Cell* **31**, 2768–2788.
- Kato M, Sakai M, Adachi K, Ikemoto H, Sano H.** 1996. Distribution of betaine lipids in marine algae. *PHYTOCHEMISTRY* **42**, 1341–1345.
- Künzler K, Eichenberger W.** 1997. Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi. *Phytochemistry* **46**, 883–892.
- Künzler K, Eichenberger W, Radunz A.** 1997. Intracellular localization of two betaine lipids by cell fractionation and immunomicroscopy. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences* **52**, 487–495.
- Li-Beisson Y, Beisson F, Riekhof W.** 2015. Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* **82**, 504–522.
- Makewicz A, Gribo C, Eichenberger W.** 1997. Lipids of *Ectocarpus fasciculatus* (Phaeophyceae). Incorporation of [¹⁴C]Oleate and the Role of TAG and MGDG in Lipid Metabolism. *Plant and Cell Physiology* **38**, 952–962.
- Maxwell K, Johnson GN.** 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659–668.
- Mei C, Michaud M, Cussac M, Albrieux C, Gros V, Maréchal E, Block MA, Jouhet J, Rébeillé F.** 2015. Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures. *Scientific Reports* **5**, 15207.
- Mühlroth A, Winge P, El Assimi A, Jouhet J, Maréchal E, Hohmann-Marriott MF, Vadstein O, Bones AM.** 2017. Mechanisms of Phosphorus Acquisition and Lipid Class Remodeling under P Limitation in a Marine Microalga. *Plant Physiology* **175**, 1543–1559.
- Murakami H, Nobusawa T, Hori K, Shimojima M, Ohta H.** 2018. Betaine Lipid Is Crucial for Adapting to Low Temperature and Phosphate Deficiency in *Nannochloropsis*. *Plant Physiology* **177**, 181–193.

- Nakamura Y.** 2021. Headgroup biosynthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in seed plants. *Progress in Lipid Research* **82**, 101091.
- Nakamura Y, Koizumi R, Shui G, Shimojima M, Wenk MR, Ito T, Ohta H.** 2009. Arabidopsis lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 20978–20983.
- Nelson NO, Janke RR.** 2007. Phosphorus Sources and Management in Organic Production Systems. *HortTechnology* **17**, 442–454.
- Oishi Y, Otaki R, Iijima Y, Kumagai E, Aoki M, Tsuzuki M, Fujiwara S, Sato N.** 2022. Diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine-dependent lipid remodeling in a green alga, *Chlorella kessleri*. *Communications Biology* **5**, 19.
- Oliver MJ, Tuba Z, Mishler BD.** 2000. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* **151**, 85–100.
- Petroutsos D, Amiar S, Abida H, 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.
- Poirier Y, Bucher M.** 2002. Phosphate Transport and Homeostasis in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* **2002**.
- Poirier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J.** 1991. Mutant of Arabidopsis Deficient in Xylem Loading of Phosphate 1. *Plant Physiology* **97**, 1087–1093.
- Rainteau D, Humbert L, Delage E, et al.** 2012. Acyl Chains of Phospholipase D Transphosphatidylation Products in Arabidopsis Cells: A Study Using Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *PLOS ONE* **7**, e41985.
- Riekhof WR, Andre C, Benning C.** 2005a. Two enzymes, BtaA and BtaB, are sufficient for betaine lipid biosynthesis in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **441**, 96–105.
- Riekhof WR, Naik S, Bertrand H, Benning C, Voelker DR.** 2014. Phosphate Starvation in Fungi Induces the Replacement of Phosphatidylcholine with the Phosphorus-Free Betaine Lipid Diacylglyceryl-N,N,N-Trimethylhomoserine. *Eukaryotic Cell* **13**, 749–757.
- Riekhof WR, Sears BB, Benning C.** 2005b. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell* **4**, 242–252.
- Rozentsvet OA.** 2004. Comparative examination of distribution of phospholipids and a betaine lipid DGTS in tropical fern species. *Biochemical Systematics and Ecology* **32**, 303–311.
- Sato N.** 1991. Lipids in *Cryptomonas CR-1*. II. Biosynthesis of Betaine Lipids and Galactolipids. *Plant and Cell Physiology* **32**, 845–851.
- Sato N.** 1992. Betaine lipids. *The botanical magazine = Shokubutsu-gaku-zasshi* **105**, 185–197.
- Shimojima M, Madoka Y, Fujiwara R, Murakawa M, Yoshitake Y, Ikeda K, Koizumi R, Endo K, Ozaki K, Ohta H.** 2015. An engineered lipid remodeling system using a galactolipid synthase promoter during phosphate starvation enhances oil accumulation in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Simionato D, Block MA, La Rocca N, Jouhet J, Maréchal E, Finazzi G, Morosinotto T.** 2013. The Response of *Nannochloropsis gaditana* to Nitrogen Starvation Includes De Novo Biosynthesis of Triacylglycerols, a Decrease of Chloroplast Galactolipids, and Reorganization of the Photosynthetic Apparatus. *Eukaryotic Cell* **12**, 665–676.
- Smit AL, Bindraban PS, Schröder JJ, Conijn JG, Meer HG.** 2009. Phosphorus in Agriculture: Global Resources, Trends and Developments. Ministry of Agriculture, 1–33.

- Tiessen H.** 2008. Phosphorus in the global environment. In: White PJ, Hammond JP, eds. *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1–7.
- To A, Valon C, Savino G, Guillemot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F.** 2006. A Network of Local and Redundant Gene Regulation Governs Arabidopsis Seed Maturation. *The Plant Cell* **18**, 1642–1651.
- Uwizeye C, Decelle J, Jouneau P-H, et al.** 2021. Morphological bases of phytoplankton energy management and physiological responses unveiled by 3D subcellular imaging. *Nature Communications* **12**, 1049.
- Van Mooy BAS, Fredricks HF, Pedler BE, et al.** 2009. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* **458**, 69–72.
- Vanhercke T, Dyer JM, Mullen RT, Kilaru A, Rahman MdM, Petrie JR, Green AG, Yurchenko O, Singh SP.** 2019. Metabolic engineering for enhanced oil in biomass. *Progress in Lipid Research* **74**, 103–129.
- Vaskovsky VE, Khotimchenko SV, Boolugh EM.** 1998. Distribution of diacylglycerotrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in mushrooms. *Phytochemistry* **47**, 755–760.
- Vitousek PM, Naylor R, Crews T, et al.** 2009. Nutrient Imbalances in Agricultural Development. *Science* **324**, 1519–1520.
- Vogel G, Eichenberger W.** 1992. Betaine Lipids in Lower Plants. Biosynthesis of DGTS and DGTA in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) and the Possible Role of DGTS in Lipid Metabolism. *Plant and Cell Physiology* **33**, 427–436.
- Yang W, Moroney JV, Moore TS.** 2004. Membrane lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: ethanolaminephosphotransferase is capable of synthesizing both phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **430**, 198–209.
- Yin C, Andersson MX, Zhang H, Aronsson H.** 2015. Phosphatidylcholine is transferred from chemically-defined liposomes to chloroplasts through proteins of the chloroplast outer envelope membrane. *FEBS Letters* **589**, 177–181.
- Zhang Y, He J, Jia L-J, Yuan T-L, Zhang D, Guo Y, Wang Y, Tang W-H.** 2016. Cellular Tracking and Gene Profiling of *Fusarium graminearum* during Maize Stalk Rot Disease Development Elucidates Its Strategies in Confronting Phosphorus Limitation in the Host Apoplast. *PLoS Pathogens* **12**, e1005485.
- Zhou X-R, Bhandari S, Johnson BS, Kotapati HK, Allen DK, Vanhercke T, Bates PD.** 2020. Reorganization of Acyl Flux through the Lipid Metabolic Network in Oil-Accumulating Tobacco Leaves1 [OPEN]. *Plant Physiology* **182**, 739–755.

3. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis d'apporter de nouveaux éléments utiles à la compréhension du rôle et des propriétés du DGTS chez les organismes. L'objectif a été d'étudier l'impact de la production de ce lipide sur les plantes supérieures en utilisant les modèles *A. thaliana* et *N. benthamiana*, respectivement transformées de manière stable et transitoire avec le gène *BTA1*.

Les expériences initiales menées chez *N. benthamiana* ont montré que la production transitoire du DGTS dans les feuilles était particulièrement efficace. Différentes enzymes provenant d'organismes marins ou d'eau douce se sont révélées fonctionnelles dans ce système hétérologue et ont généré d'importantes quantités de DGTS. Ces résultats montrent que les substrats naturellement produits par la plante sont bien disponibles et il semble probable que la perte de la synthèse du DGTS chez les organismes terrestres soit uniquement due à l'absence du gène *BTA1*.

Les analyses lipidiques des feuilles transformées de *N. benthamiana* indiquent que le DGTS est massivement synthétisé et peut représenter plus de 20 % des glycérolipides totaux produits. Cette forte production a cependant peu d'impacts sur la proportion des autres glycérolipides et leur composition en acides gras. Ces résultats suggèrent que la voie de synthèse du DGTS est indépendante de celle des autres glycérolipides synthétisés dans le réticulum endoplasmique ; il semble donc probable que le DGTS soit principalement issu d'un pool de DAG synthétisé *de novo*. Malgré sa forte accumulation dans les feuilles transformées, le DGTS ne semble pas être transféré dans les chloroplastes et reste localisé dans les membranes extraplastidiales. L'importante prolifération du réticulum endoplasmique détectée lors des analyses de microscopie électronique confirme ces observations. Tout comme chez les algues, le DGTS semble remplir sa fonction de composant structural des membranes extraplastidiales. Son induction sous le contrôle du promoteur 35S explique probablement sa surproduction dans les feuilles de *N. benthamiana*. L'importante production de DGTS générée par l'enzyme MgBTA1 semble également légèrement affecter l'efficacité de la photosynthèse. Bien que la morphologie des chloroplastes ne semble pas affectée dans cette condition, l'accumulation des membranes du réticulum endoplasmique pourrait avoir un effet négatif sur leur structure. Une analyse plus poussée du volume et de la morphologie des chloroplastes en présence de DGTS serait nécessaire pour approfondir cette hypothèse.

Il est également intéressant de noter l'écart important entre les quantités de DGTS produites par les enzymes MgBTA1 et PtBTA1. Il est difficile de savoir si ces différences sont liées à une quantité plus importante de protéine MgBTA1 dans les cellules (forte expression en microscopie confocal) ou à une

meilleure efficacité de cette dernière. La forte expression du contrôle négatif nf-PtBTA1 n'induit qu'une production minime de DGTS et suggère donc que ces deux paramètres ne sont pas nécessairement liés. Il serait intéressant d'analyser l'expression et l'efficacité d'un plus large panel de protéines BTA1. La première TLC réalisée avec les enzymes provenant de la bryophyte *Marchantia polymorpha*, de la levure *Kluyveromyces lactis* et de la microalgue verte *C. reinhardtii* a démontré que ces protéines étaient également fonctionnelles chez les plantes. Elles seraient donc de bonnes candidates pour étudier plus en détail le comportement d'enzymes BTA1 issues d'organismes plus divers tels que les bryophytes, les levures et les algues vertes. D'éventuelles tendances pourraient émerger de ces études et être comparées à celles observées chez les straménopiles déjà testés (*P. tricornutum* et *M. gaditana*).

La production transitoire de DGTS a démontré son efficacité dans les structures très hydratées que représentent les feuilles de *N. benthamiana*. L'obtention de lignées transgéniques stables d'*A. thaliana* a été cependant plus laborieuse. De premières tentatives de transformation avec le promoteur constitutif 35S ont été réalisées sur ce modèle et aucune graine n'a été produite par les plantes issues de ces essais. Les hypothèses émises par (Bolik et al., 2023) concernant l'incompatibilité du DGTS avec l'environnement terrestre semblent concorder avec ces résultats. Comme évoqué précédemment, les propriétés physiques du DGTS dans les membranes rendraient ces dernières plus sensibles à l'hydratation ; la production du DGTS serait donc probablement délétère pour la formation de la graine, seule structure hautement déshydratée chez les plantes supérieures. Chez les plantes primitives, la dégradation du DGTS observée pendant les périodes de sécheresse confirme d'autant plus cette hypothèse. Afin d'approfondir cet axe, des lignées stables d'*A. thaliana* exprimant le gène *MgBTA1* sous le contrôle d'un promoteur inductible au dexaméthasone ont été générées en interne au laboratoire LPCV. Chez ces lignées, l'expression du gène *BTA1* peut être induite par simple pulvérisation de dexaméthasone sur la plante, permettant ainsi la production ciblée de DGTS dans l'espace et le temps. L'impact du DGTS pourra ainsi être étudié sur des organes spécifiques à différents stades de développement de la plante. L'application de dexaméthasone au niveau de l'inflorescence permettrait d'étudier l'impact direct du DGTS sur la formation des graines et d'éventuellement confirmer son effet délétère dans ce processus. L'application de dexaméthasone sur des plantules exposées à un stress hydrique pourrait également apporter des informations intéressantes quant à l'impact du DGTS en période de sécheresse. Si les plantules produisant du DGTS se retrouvent affectées dans leur réponse au stress hydrique, l'hypothèse expliquant la disparition du DGTS chez les plantes supérieures serait consolidée. Enfin, ces plantules pourraient être observées en microscopie électronique afin d'étudier l'impact de la sécheresse sur l'architecture des membranes lorsque le DGTS est présent.

Lors de cette étude, des lignées stables d'*A. thaliana* exprimant le gène *MgBTA1* sous le contrôle d'un promoteur inductible à la carence de Pi (pMGD3) ont été générées et analysées. Les cals et les plantules issues de ces lignées ont été cultivés en condition de carence de Pi afin d'induire la synthèse du DGTS. Contrairement aux feuilles infiltrées de *N. benthamiana*, les cals et les plantules n'ont produit qu'une faible quantité de DGTS, ce dernier n'excédant pas 5 % des glycérolipides totaux. Cette faible production est probablement liée à l'activité du promoteur pMGD3 qui est largement inférieure à celle du promoteur constitutif 35S. Tout comme chez *N. benthamiana*, la production du DGTS ne semble pas avoir d'effet majeur sur la synthèse des autres glycérolipides. Chez les plantules transgéniques, le remodelage lipidique engendré par la carence de Pi s'opère de manière similaire à celle des plantules sauvages. Le niveau de DGDG augmente tandis que celui des phospholipides diminue, que le DGTS soit produit ou non. Le phénotype des plantules transgéniques reste également similaire à celui des plantules sauvages lorsque le Pi est limitant. La production de DGTS ne semble donc pas modifier la stratégie d'adaptation des plantes face à la carence de Pi et son utilisation n'est probablement pas avantageuse pour améliorer leur tolérance. Les plantes terrestres semblent ainsi avoir développé des mécanismes de remodelages lipidiques spécifiquement adaptés à leur milieu et il paraît peu probable qu'elles puissent les modifier.

Chapitre 2 : Etude du rôle des bétaines lipides chez la microalgue *Phaeodactylum tricornutum*

1. Préambule

Le second axe de ce projet vise à étudier le rôle des bétaine lipides chez un organisme qui les produit naturellement. La diatomée *P. tricornutum* a été choisie pour cette étude ; c'est un organisme modèle couramment utilisé dans la recherche sur les microalgues. Son génome est entièrement séquencé (Bowler et al., 2008) et plusieurs bases de données transcriptomiques et protéomiques sont disponibles (Maheswari et al., 2005; Sapriel et al., 2009). Facilement cultivable en laboratoire, cet organisme dispose également d'outils moléculaires efficaces pour l'édition du génome (Karas et al., 2015).

Comme évoqué précédemment, les diatomées ont développé des mécanismes d'adaptation particulièrement efficaces pour s'adapter aux variations des conditions de leur environnement. Les carences nutritionnelles figurent parmi les stress les plus fréquemment rencontrés chez ces organismes et la carence de Pi a la particularité d'induire un remodelage massif des lipides membranaires. Chez *P. tricornutum*, la carence de Pi engendre une augmentation drastique des TAG, une légère augmentation des glycérolipides plastidiaux ainsi qu'une disparition quasi-totale des phospholipides (**Figure 14**). Ces derniers sont hydrolysés afin de libérer une source de Pi supplémentaire. Leur dégradation est alors compensée par l'augmentation de la production de glycérolipides non phosphorés tels que le DGTA, le DGDG et le SQDG. Lors de la carence de Pi, le SQDG semble se substituer au PG dans les membranes plastidiales car le ratio SQDG:PG se retrouve augmenté d'un facteur 2 dans cette condition (Cañavate et al., 2017). Le ratio DGTA:phospholipides est également fortement modulé et se retrouve 30 fois plus élevé en situation de carence (Cañavate et al., 2017). Plusieurs études ont montré que les bétaine lipides étaient spécifiquement impliqués dans le remplacement des phospholipides des membranes extraplastidiales lors de la carence de Pi (Degraeve-Guilbault et al., 2017; Huang et al., 2019; Lu et al., 2013; Meng et al., 2019; Mühlroth et al., 2017; Van Mooy et al., 2009) (*cf.* Introduction section III.). Cela semble également être le cas pour le DGTA chez *P. tricornutum* : sa quantité γ est 5 fois plus élevée lors d'une carence prolongée en Pi, atteignant un niveau similaire à celui de la PC en conditions normales (Abida et al., 2015). Ces résultats suggèrent un remplacement conséquent de la PC par le DGTA ; ces lipides sont tous-deux synthétisés dans le réticulum endoplasmique et seraient facilement interchangeables au sein des membranes (Bolik et al., 2023). Le ratio DGDG:phospholipides est également augmenté en carence de Pi chez *P. tricornutum* (Abida et al., 2015; Cañavate et al., 2017) et suggère un potentiel remplacement des

phospholipides dégradés par le DGDG, bien que cette hypothèse n'ait jamais été confirmée (cf. Introduction section II.2.).

Le DGTA est l'unique bétaine lipide détecté chez *P. tricornutum*. La voie de synthèse de ce lipide n'est pas encore élucidée bien que quelques hypothèses aient été évoquées. Le DGTA est l'isomère structural du DGTS et plusieurs études ont suggéré que le DGTS agissait comme précurseur dans la voie de synthèse du DGTA (Sato, 1991; Vogel & Eichenberger, 1992). Le DGTA serait obtenu par une modification de la tête polaire du DGTS, impliquant le transfert du groupe carboxyle d'un carbone à un autre par un processus de décarboxylation et de carboxylation (cf. Introduction section III.). Une analyse transcriptionnelle de *P. tricornutum* a révélé la présence du gène putatif *BTA1* dans son génome (Cruz de Carvalho et al., 2016). Bien que ce gène ait été initialement identifié comme une DGTS synthase (Riekhof, Sears, et al., 2005), son expression fortement induite en condition de carence de Pi coïncide avec l'accumulation de DGTA (Cruz de Carvalho et al., 2016). Des expériences préliminaires au laboratoire ont permis de tester la fonction de l'enzyme BTA1 de *P. tricornutum* (PtBTA1) en système hétérologue. L'expression de PtBTA1 a généré la production de DGTS, prouvant ainsi que le gène *BTA1* est bien responsable de la synthèse de ce lipide, même chez les organismes produisant uniquement du DGTA (cf. Introduction section III.). Ces résultats renforcent ainsi l'hypothèse selon laquelle le DGTS intervient comme intermédiaire dans la synthèse du DGTA. Cependant, le ou les gène(s) responsable(s) de la conversion entre ces deux lipides restent encore inconnus.

Il subsiste ainsi quelques incertitudes quant au rôle et à la synthèse du DGTA chez *P. tricornutum*. Le DGTA semble jouer un rôle essentiel dans l'adaptation de cet organisme à la carence de Pi ; sa synthèse est fortement augmentée dans cette condition et il est considéré comme un excellent substitut aux phospholipides au sein des membranes extraplastidiales. Cependant, aucune expérience *in vivo* n'a encore été réalisée pour confirmer ce rôle spécifique. L'objectif de cette recherche est donc d'apporter des éléments supplémentaires à cette hypothèse en étudiant l'impact de l'absence du DGTA sur le phénotype et la tolérance de *P. tricornutum*. La synthèse du DGTA semble dépendre de l'activité du gène *BTA1* et c'est pourquoi des souches mutées dans le gène *BTA1* ont été générées pour répondre à ces questions. L'analyse de ces mutants permettra également de valider l'implication de PtBTA1 dans la voie de synthèse du DGTA et d'ainsi consolider l'hypothèse de la conversion DGTS-DGTA chez les organismes tels que *P. tricornutum*.

2. Résultats de l'étude

2.1. Génération de mutants KO par la méthode CRISPR-Cas9

La stratégie utilisée pour étudier la fonction de *PtBTA1* a été de générer des mutations ciblées à différentes positions de ce gène. Ces mutations induisent, chez l'organisme modifié, la traduction de protéines tronquées dont l'activité est supprimée ou du moins diminuée. La méthode CRISPR-Cas9, efficace chez les diatomées, a été utilisée pour introduire ces mutations dans le génome. Les vecteurs contenant les ARN guides ont été insérés dans les cellules par conjugaison bactérienne. Cette technique utilise un épisode capable de se répliquer de manière autonome dans la cellule de la diatomée ; il contient les éléments nécessaires à la génération de mutations (Cas9 et ARN guide) mais également les éléments responsables de sa transmission de la bactérie (*E. coli*) vers la cellule receveuse (*P. tricornutum*) par la formation d'un pilus bactérien (Karas et al., 2015). La conjugaison bactérienne permet ainsi de s'affranchir des risques de perturbations de gènes essentiels car la cassette CRISPR-Cas9 n'est pas insérée dans le génome de l'organisme.

Des ARN guides ont donc été conçus pour cibler les domaines catalytiques connus du gène *PtBTA1* (Phatr3_J42872) (**Figure 16**). Comme évoqué précédemment, le gène *BTA1* a été caractérisé chez de nombreux organismes. Chez les eucaryotes, il code une enzyme bifonctionnelle (Murakami et al., 2018; Riekhof et al., 2014; Riekhof, Sears, et al., 2005) composée de deux domaines catalytiques : le domaine DUF3419 est responsable de la conversion du DAG en diacylglycérilhomosérine (DGHS), lequel est ensuite converti en DGTS par le domaine Méthyltransférase (**Figure 16A**). Ces deux domaines ont donc été la cible des mutations générées chez *P. tricornutum* afin d'étudier leur fonction respective. Trois mutants KO ont été sélectionnés pour l'analyse ; les mutations générées ont induit un décalage du cadre de lecture et une apparition d'un codon stop prématuré sur la séquence du gène, aboutissant théoriquement à la traduction de protéines tronquées. Les détails de ces mutations sont présentés en **figure 16B**. Les mutants 26l6 et 27b1 présentent respectivement une mutation localisée en amont et en aval du domaine DUF3419 tandis que la souche 4i1 présente une mutation localisée dans le domaine Méthyltransférase. Le mutant 26l6 est donc théoriquement impacté dans l'entièreté de la voie de synthèse du DGTS. Les souches 27b1 et 4i1 seraient quant à elles en mesure de produire du DGHS car le premier domaine (DUF3419) est toujours présent dans la protéine potentiellement traduite.

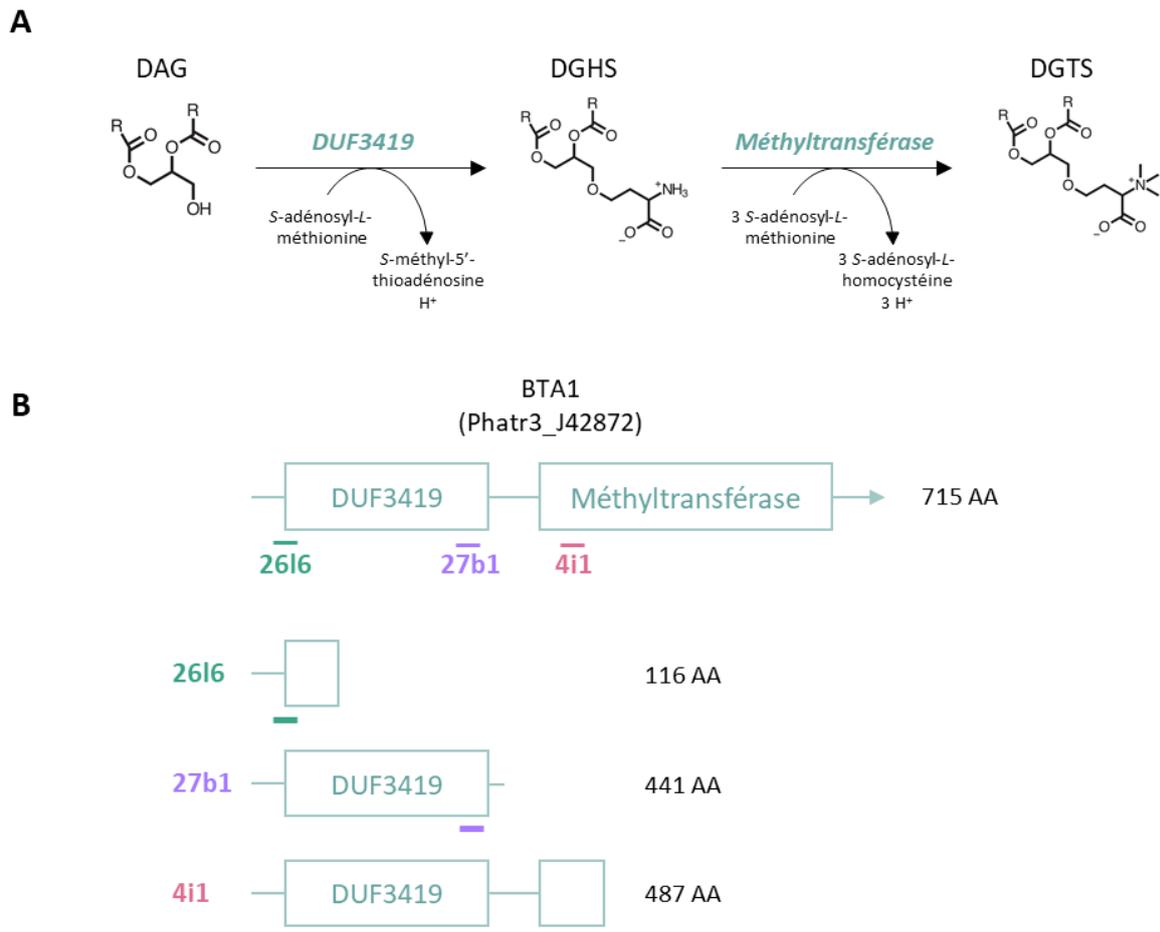


Figure 16. Description des souches KO de *P. tricornutum* impactées dans la voie de synthèse du DGTS

(A) Voie de synthèse du DGTS chez les organismes eucaryotes possédant le gène *BTA1*.

(B) Représentation schématique de la localisation des ARN guides sur le gène *PtBTA1* et conséquences sur la synthèse de la protéine PtBTA1 chez les mutants obtenus.

AA : longueur de la protéine en acides aminés.

2.2. Validation de l'implication du gène *BTA1* dans la synthèse du DGTA

Le premier objectif de cette analyse a été de tester l'implication du gène *PtBTA1* dans la synthèse du DGTA. Cette analyse préliminaire a été effectuée uniquement sur le mutant 4i1, chez lequel le premier domaine est toujours présent. La souche 4i1 ainsi que la souche sauvage ont donc été mises en culture et récoltées afin d'en extraire les lipides produits. Ces lipides extraits ont été séparés par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle (TLC 2D) et les résultats sont présentés en **figure 17**. Contrairement à la souche sauvage, le DGTA n'est pas produit chez le mutant 4i1. La mutation du gène de synthèse du DGTS a donc un impact direct sur la production de DGTA chez *P. tricornutum*, confirmant ainsi l'hypothèse selon laquelle le DGTS agit comme un précurseur dans sa voie de synthèse. De plus, aucune tâche supplémentaire pouvant s'apparenter à du DGHS n'est apparue sur les analyses du mutant 4i1, impacté seulement dans le deuxième domaine catalytique de la protéine

PtBTA1 (**Figure 16B**). Ce phénomène pourrait s'expliquer par un arrêt de la transcription du gène ou une instabilité de la protéine produite ; il est probable que la séquence complète soit nécessaire à la bonne conformation de la protéine. Il est également possible que le DGHS, s'il est produit, soit rapidement dégradé dans la cellule, le rendant ainsi non détectable sur les analyses.

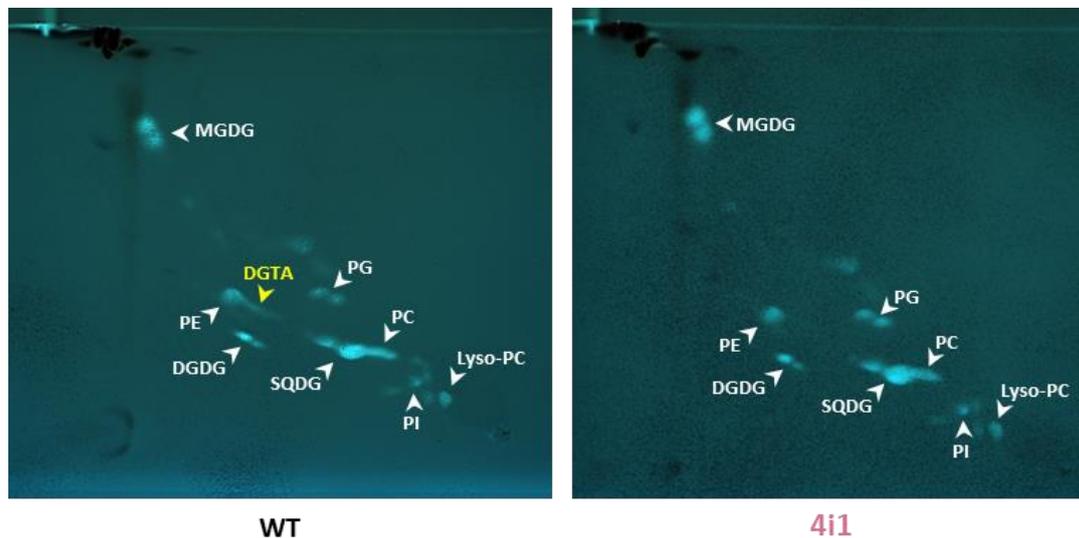


Figure 17. Séparation par TLC-2D des glycérolipides extraits de *P. tricornutum*. L'analyse a été effectuée sur la souche sauvage (WT) et la souche mutante 4i1.

2.3. Impact de l'absence du DGTA sur la croissance et la morphologie des cellules de *P. tricornutum*

Après avoir validé la suppression de la production du DGTA chez un des mutants générés, un suivi de la croissance et de la morphologie des cellules a été réalisé. Les différentes souches ont été cultivées en milieu liquide pendant cinq jours en présence et en absence de Pi afin d'étudier l'impact de l'absence du DGTA sur leur vitesse de croissance et leur phénotype morphologique. Concernant les suivis de croissance, aucune différence notable n'a été détectée entre la souche sauvage et les souches mutantes en conditions normales (**Figure 18A**). L'augmentation de la concentration de cellules au jour 5 pour la souche 27b1 est due à une valeur aberrante pour l'un des trois réplicats et d'autres répétitions devront être réalisées pour diminuer ce biais. Lorsque le milieu est dépourvu de Pi (-Pi), la croissance de l'ensemble des souches est ralentie par rapport à celle observée en conditions normales (**Figure 18A**), comme le rapportent de précédentes études réalisées chez *P. tricornutum* (Cruz de Carvalho et al., 2016). Une différence significative est cependant observée entre la souche sauvage et les souches mutantes dès le troisième jour du suivi (**Figure 18B**). En effet, la croissance est d'autant plus ralentie chez les mutants ; ces résultats suggèrent donc que le DGTA est nécessaire au maintien

de la croissance des cellules en situation de carence. Toutefois, la production de DGTA ne semble pas essentielle à la croissance des cellules en conditions normales.

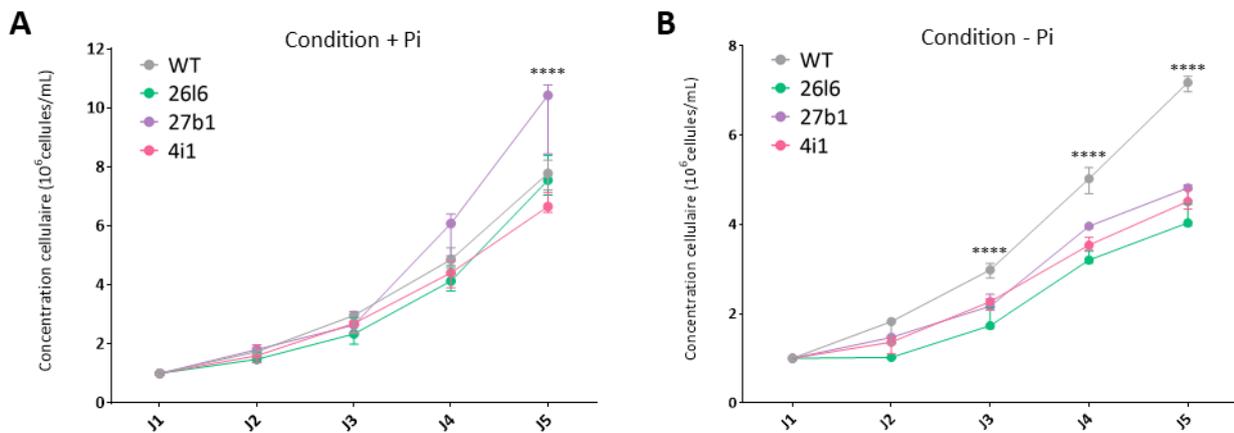


Figure 18. Suivi de croissance des souches 26I6, 27b1, 4i1 et sauvage (WT) en présence (A) ou en absence (B) de Pi. Chaque point correspond à la valeur médiane de la concentration cellulaire exprimée en millions de cellules par mL. Les barres d'erreurs correspondent aux minimum et maximum de ces valeurs. n=3

(A) Les astérisques indiquent une différence significative entre la souche 27b1 et la souche WT. (B) Les astérisques indiquent une différence significative entre les trois souches mutantes et la souche WT (**** $P < 0,0001$). Les statistiques ont été réalisées par un test ANOVA à 2 voies, avec une vérification préalable de la normalité des valeurs par les test de Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov.

Les cellules cultivées en présence et en absence de Pi ont également été observées par microscopie optique à différents temps du suivi (Figure 19). En conditions normales, aucune différence visible n'a été détectée entre la souche sauvage et les souches mutantes. La morphologie du chloroplaste des mutants est similaire à celle observée chez le contrôle sauvage, quel que soit le jour d'observation. En condition de carence de Pi, la morphologie de l'ensemble des souches est progressivement altérée. La forme des cellules s'arrondit et des gouttelettes lipidiques s'accumulent, notamment au jour 8 (Figure 19). Toutefois, l'accumulation des gouttelettes lipidiques semble apparaître plus précocement chez les souches mutantes. Ces dernières présentent des gouttelettes dès le cinquième jour tandis que la souche sauvage les accumule principalement au jour 8, comme le rapportent les précédentes études (Cruz de Carvalho et al., 2016). L'absence du DGTA induirait donc une accumulation plus précoce des TAG en situation de carence de Pi. Des informations complémentaires concernant ces aspects sont détaillées dans la partie suivante.

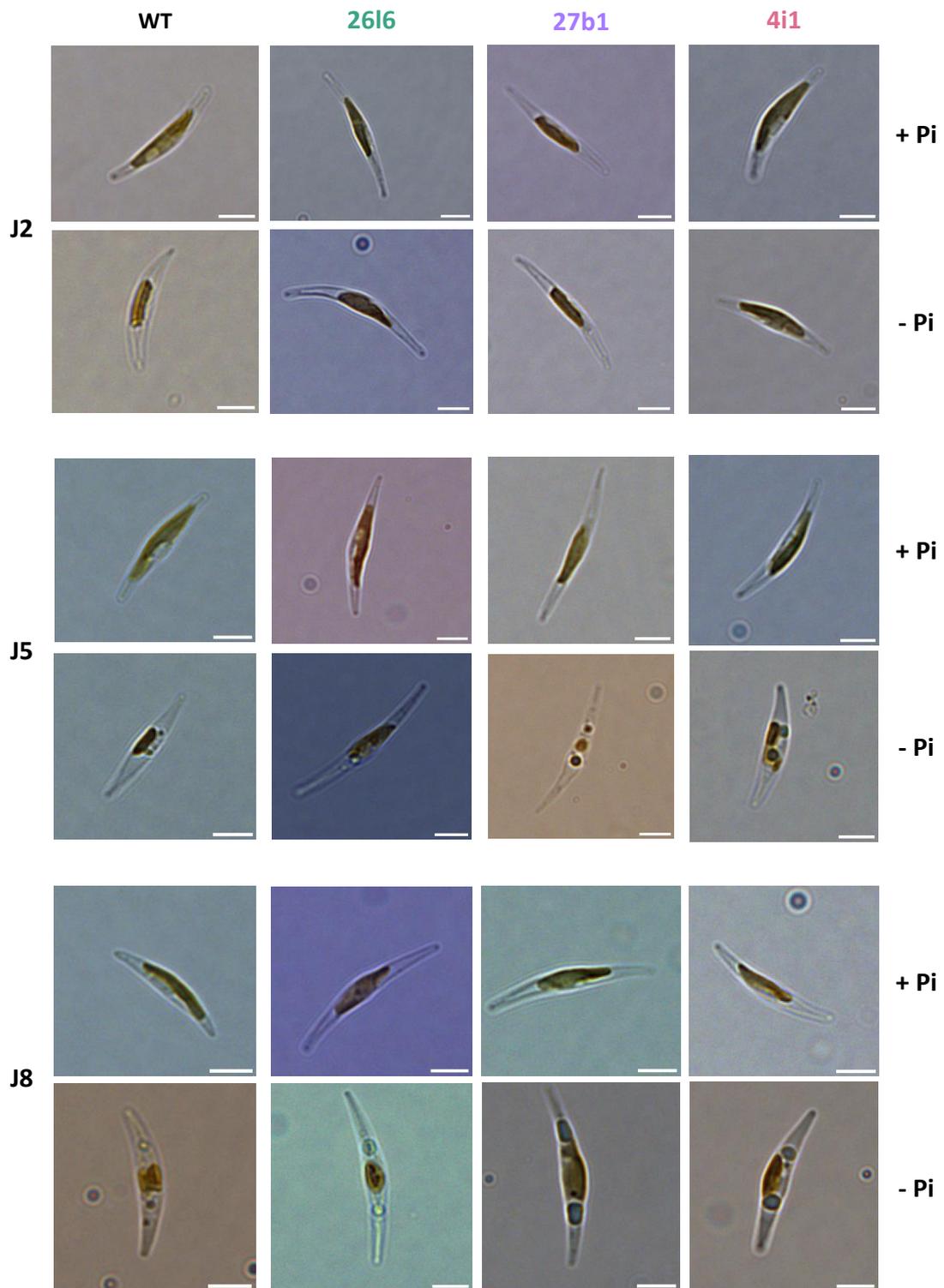


Figure 19. Observations des cellules de *P. tricornutum* lors du suivi de croissance. Les photographies ont été prises avec le microscope optique Zeiss Scope A1 (grossissement x100), à deux (J2), quatre (J4) et huit (J8) jours après l'ensemencement des cellules dans un milieu contrôlé (+ Pi) ou dans un milieu dépourvu de Pi (-Pi). Barre d'échelle : 5 μ m

2.4. Impact de l'absence du DGTA sur le profil lipidique des cellules de *P. tricornutum*

Ainsi, l'absence du DGTA semble avoir un impact négatif sur la croissance des cellules en situation de carence de Pi. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces observations, une analyse du glycérolipidome a été réalisée sur les cellules cultivées en présence (+Pi) et en absence de Pi (-Pi). Les cellules ont été récoltées après quatre jours de culture pour la condition +Pi (+Pi J4), ce qui correspond à la phase exponentielle de croissance avant l'apparition d'un milieu limité en nutriment. Pour la condition -Pi, les cellules ont été récoltées après quatre (-Pi J4) et huit (-Pi J8) jours de culture, permettant ainsi d'étudier l'évolution de l'adaptation des cellules à la carence de Pi. Un problème technique est survenu lors de l'analyse du mutant 27b1 en condition -Pi J8, ce qui explique qu'un seul réplicat soit représenté sur les données quantitatives de cet échantillon (**Figures 20A, 21, 22 et 23**).

Dans un premier temps, les lipides extraits des cellules récoltées ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID) afin d'étudier la quantité et la diversité des acides gras produits (**Figure 20**). Au jour 4 et en conditions normales, la quantité totale d'acides gras produite chez les mutants est légèrement inférieure à celle de la souche sauvage (**Figure 20A**). Cette tendance est inversée en conditions de carence de Pi au quatrième jour ; les acides gras sont produits en plus grande quantité chez les mutants par rapport à la souche sauvage. Cette augmentation reflète probablement l'accumulation précoce des TAG observée en microscopie optique chez les mutants au jour cinq (**Figure 19**). Au huitième jour de la carence, les quantités d'acides gras totaux s'égalisent entre les mutants et la souche sauvage et sont globalement augmentées par rapport à la condition +Pi, quelle que soit la souche concernée. Ce phénomène s'explique probablement par la forte néosynthèse des TAG observée en carence de Pi chez *P. tricornutum* (**Figure 14A**) (Abida et al., 2015).

En conditions normales (+Pi J4), la distribution en acides gras des souches mutantes est similaire à celle de la souche sauvage (**Figure 20B**). Les acides gras majoritaires sont le 16:0, le 16:3 et le 20:5. Ces derniers sont principalement retrouvés dans les lipides membranaires tels que le MGDG, le SQDG et la PC en conditions normales (Abida et al., 2015). En carence de Pi, les quantités relatives de 16:3 et de 20:5 sont nettement diminuées au profit de l'augmentation graduelle de 16:0 et de 16:1, quelle que soit la souche concernée (**Figure 20B et C**). Ces observations concordent avec les données de la littérature et reflètent l'augmentation de la production de TAG, ces derniers étant majoritairement composés d'acides gras à courte chaîne tels que le 16:0 et le 16:1 (**Figure 14C**) (Abida et al., 2015). La réduction des quantités de 16:3 et de 20:5 traduit quant à elle une baisse de la proportion des lipides membranaires dans les cellules soumises à la carence en Pi. Une différence peut toutefois être notée

concernant le profil des différentes souches au quatrième jour de la carence. Chez les mutants, l'augmentation du 16:1 et la chute du 20:5 sont toutes les deux plus drastiques que chez la souche sauvage, reflétant ainsi l'accumulation plus précoce des TAG chez les mutants (**Figure 20C**). Au huitième jour de la carence, les différences entre les mutants et la souche sauvage s'estompent, à l'exception du 18:1 qui semble être plus élevé chez les souches mutantes. Ce résultat est intrigant car le 18:1 est un acide gras intermédiaire dans la synthèse des VLC-PUFAs ; il ne s'accumule généralement pas dans les cellules.

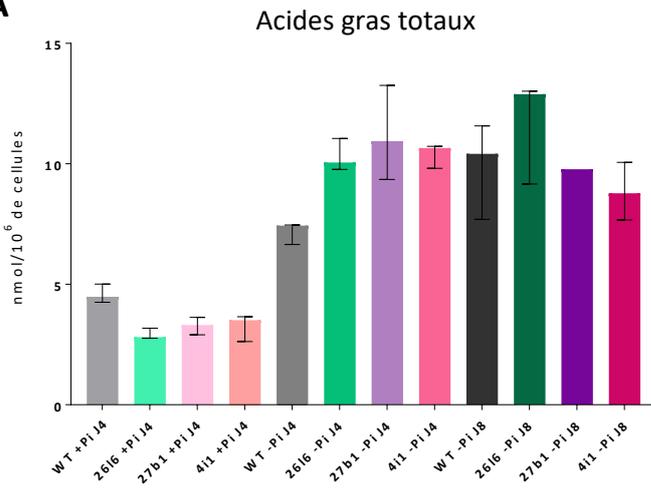
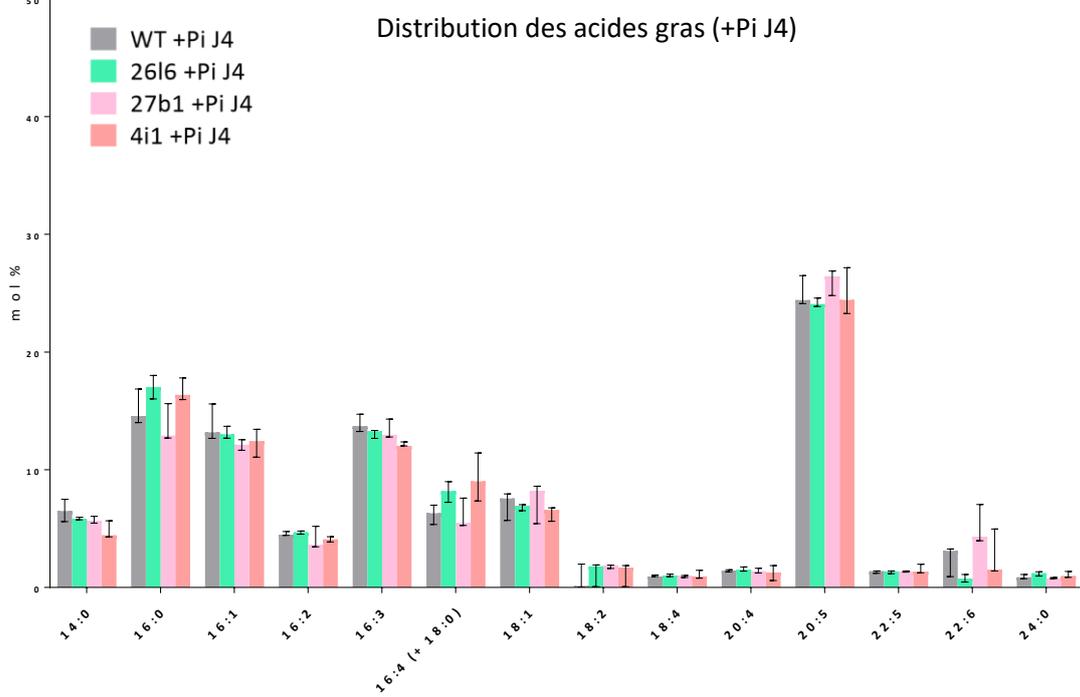
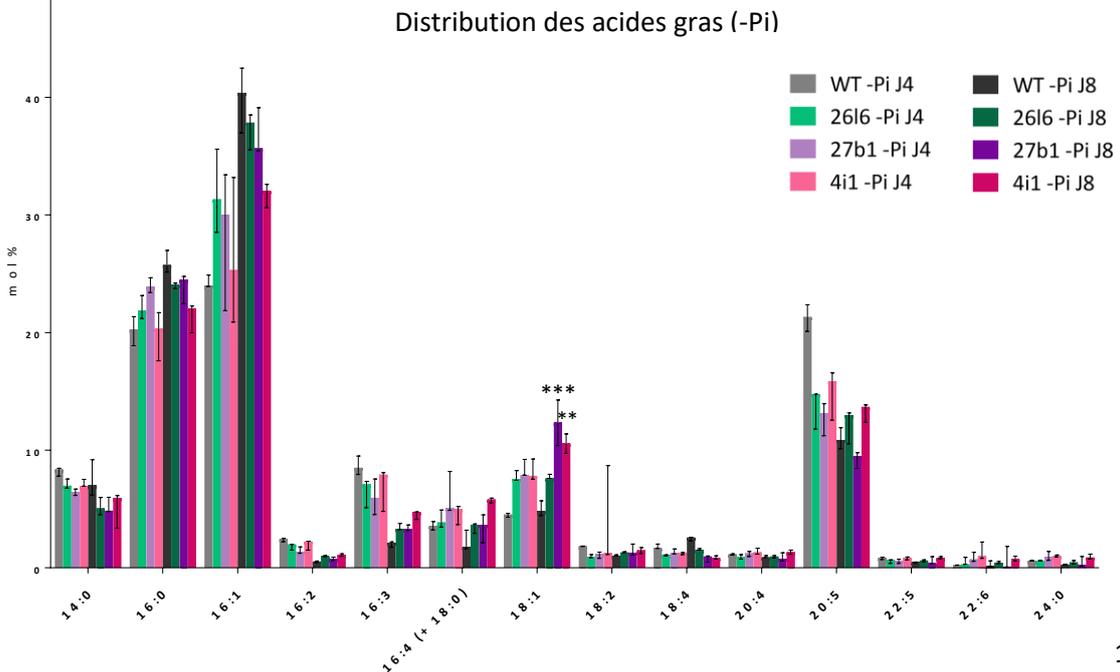
A**B****C**

Figure 20. Acides gras produits par les souches 2616, 27b1, 4i1 et sauvage (WT), cultivées en présence (+Pi) ou en absence (-Pi) de phosphate, récoltées à quatre (J4) et huit (J7) jours de culture. **(A)** Acides gras totaux en nmol/millions de cellules.

(B) et **(C)** Distribution des classes d'acides gras en condition +Pi J4 **(B)** et -Pi J4 et -Pi J8 **(C)**.

Les données ont été obtenues par GC-FID. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport à la souche WT dans la même condition (** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$). Les statistiques ont été réalisées par le test de comparaison deux à deux Kruskal-Wallis

Les lipides extraits des différents échantillons ont également été analysés par HPLC-MS/MS afin de déterminer la distribution des glycérolipides (**Figure 21**) et la diversité des espèces moléculaires au sein de chaque classe (**Figures 22 à 26**). Chez les mutants, le DGTA est bien absent (**Figure 21**). Une très faible quantité de DGTA est toutefois détectée chez la souche 2616 ; cette dernière a probablement été contaminée par la souche sauvage lors des manipulations mais son profil lipidique reste similaire à celui des deux autres mutants. Nous avons donc considéré que cette souche présentait bien un génotype mutant pour la suite des analyses.

En conditions normales (+Pi J4), le profil glycérolipidique de la souche sauvage concorde avec les données précédemment publiées (Abida et al., 2015) ; les glycérolipides plastidiaux (SQDG, MGDG, DGDG et PG) et la PC sont globalement majoritaires (**Figure 21**). Le DGTA, quant à lui, est produit en petite quantité et ne dépasse pas 3 % des glycérolipides totaux. Chez les mutants, la perte de la production du DGTA semble être compensée par une forte augmentation de la synthèse de PC, sans impact sur la quantité des autres phospholipides. Cette première observation souligne le caractère interchangeable de ces deux lipides en conditions normales. En condition de carence de Pi, le remodelage lipidique classique est observé chez la souche sauvage : les phospholipides sont massivement dégradés et compensés par l'augmentation du DGTA tandis que les TAG s'accumulent fortement (**Figure 21**). Ce remodelage des phospholipides ne semble pas avoir lieu chez les souches mutantes dépourvues de DGTA. Ces dernières présentent une quantité de PC largement supérieure à celle de la souche sauvage dans les mêmes conditions. La quantité de PI est également significativement supérieure à celle de la souche sauvage en condition de carence, de même pour le PG qui semble aussi être préservé. La dégradation des phospholipides est ainsi nettement inhibée par l'absence du DGTA. Ces observations démontrent une forte corrélation entre la synthèse du DGTA et celle de la PC. Ces deux lipides semblent en effet se substituer l'un à l'autre quelles que soient les conditions, probablement pour maintenir l'intégrité des membranes extraplastidiales. L'absence de DGTA ne semble pas avoir d'effet majeur sur la synthèse des autres glycérolipides en situation de carence ; les quantités des glycérolipides plastidiaux sont globalement équivalentes entre la souche sauvage et les mutants, à l'exception d'une légère augmentation du MGDG et du PG chez ces derniers.

La quantité de TAG est quant à elle supérieure chez les mutants au quatrième jour de la carence, démontrant une fois de plus que l'accumulation des TAG y est plus précoce (**Figure 21**). Cette observation suggère également que l'accumulation des TAG n'est pas dépendante de la dégradation des phospholipides, comme évoqué précédemment (*cf.* Introduction section II.3.) (Abida et al., 2015).

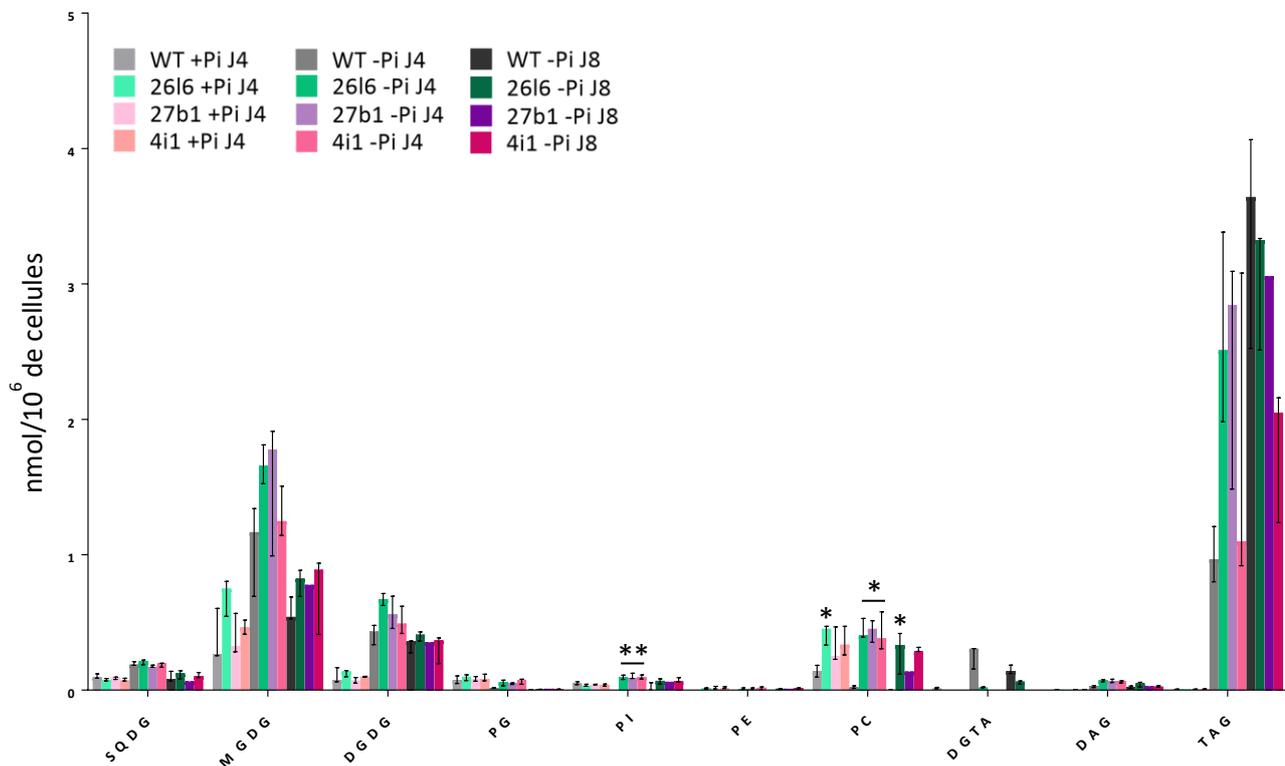
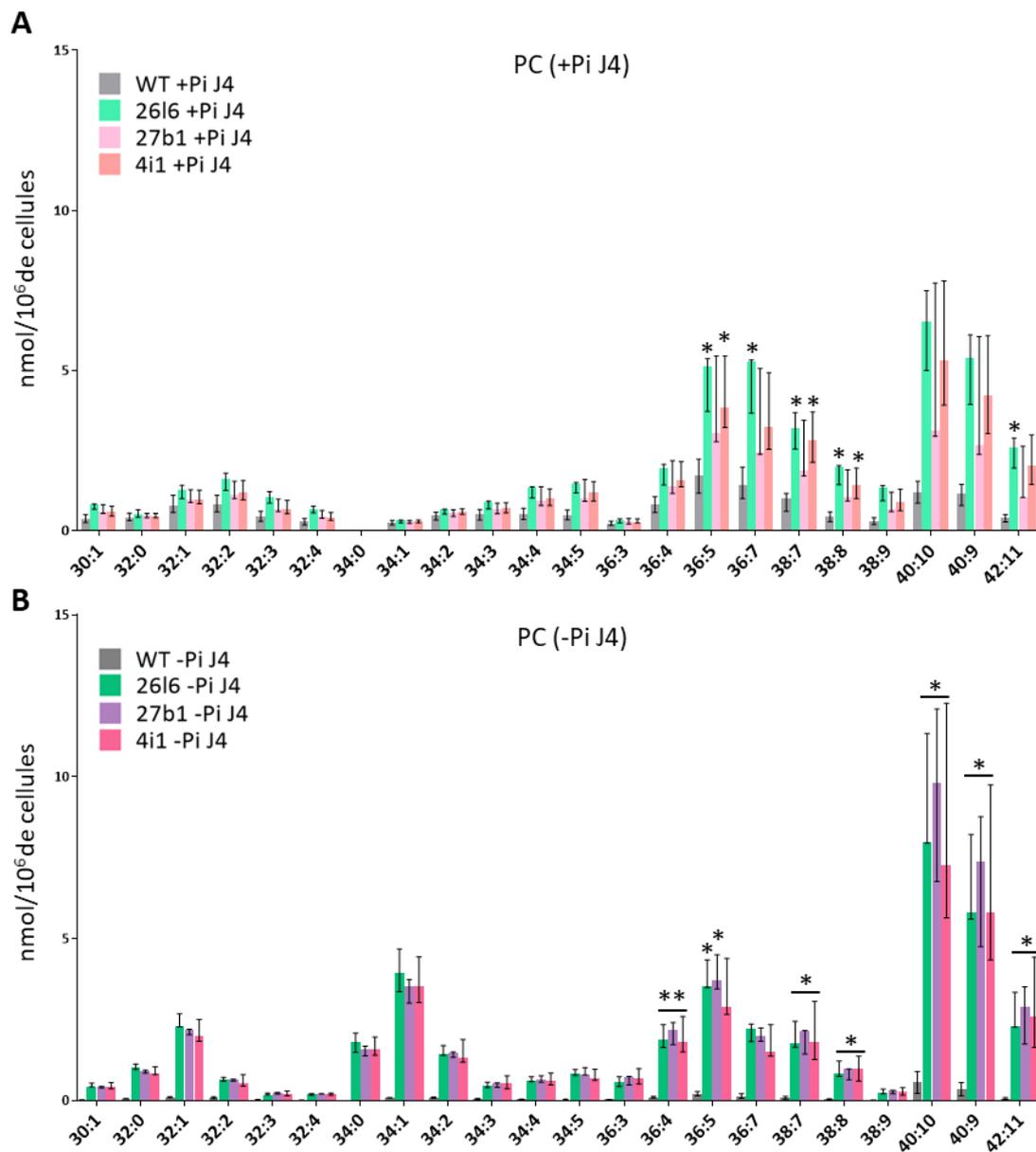


Figure 21. Distribution des glycérolipides en nmol/millions de cellules chez les souches 26l6, 27b1, 4i1 et sauvage (WT), cultivées en présence (+Pi) ou en absence (-Pi) de phosphate, récoltées à quatre (J4) et huit (J8) jours de culture. Les données ont été obtenues par HPLC-MS/MS. Un seul réplicat est représenté pour l'échantillon 27b1 -Pi J8 en raison de problèmes techniques. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport à la souche WT dans la même condition (** $P < 0,001$; * $P < 0,05$). Les statistiques ont été réalisées par le test de comparaison deux à deux Kruskal-Wallis.

Ainsi, en carence de Pi, les phospholipides semblent être largement préservés chez les mutants, en particulier la PC. En conditions normales, cette dernière est synthétisée en plus grande quantité chez les mutants par rapport à la souche sauvage. Des différences sont également visibles au niveau de sa composition en acides gras. Une augmentation des espèces 36:5, 36:7, 38:7, 40:10, 40:9 et 42:11 peut notamment être observée chez les mutants (**Figure 22A**). Chacune de ces espèces contient un (36:5, 36:7, 38:7) ou deux (40:10, 40:9 et 42:11) acide(s) gras à 20 carbones. La contribution des acides gras à chaîne longue semble donc être beaucoup plus importante dans la PC des souches mutantes en conditions normales. Au quatrième jour de la carence, toutes les espèces sont augmentées chez les mutants (**Figure 22B**). Ce phénomène est probablement lié à une légère augmentation générale de la

synthèse de PC chez ces derniers, tandis que la PC est entièrement dégradée chez la souche sauvage. Au huitième jour de carence (-Pi J8), une légère diminution de l'ensemble des espèces est observée chez les mutants, reflétant probablement une baisse globale de la teneur en lipide membranaire et un ralentissement général du métabolisme en raison de la carence prolongée (**Figure 22C**). Il est également intéressant de noter que le profil du DGTA chez la souche sauvage (**Figure 22D**) diffère de celui de la PC chez les mutants : le DGTA est plutôt riche en espèces à 32 et 34 carbones et ces dernières sont peu abondantes chez la PC. Au quatrième jour de la carence, la contribution des espèces à 36 et 40 carbones est en effet plus importante dans la PC (**Figure 22B**). Bien que cette dernière semble se substituer parfaitement au DGTA chez les mutants, l'édition des acides gras composant ces deux lipides ne semble pas suivre la même tendance.



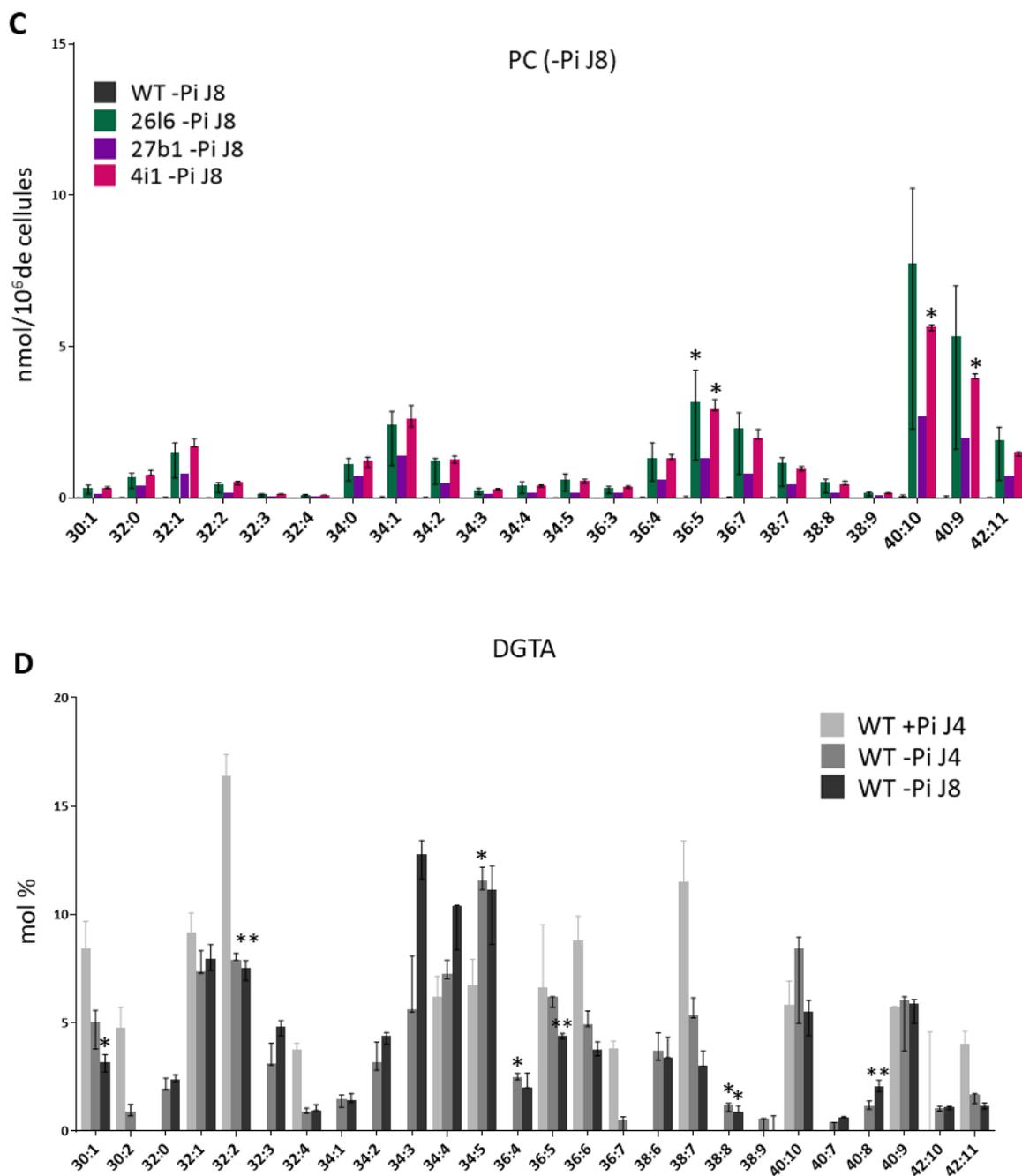


Figure 22. Distribution des acides gras parmi la PC et le DGTA.

(A, B, C) Résultats de la PC chez les souches 26I6, 27b1, 4i1 et sauvage (WT), cultivées en présence (+Pi) (A) ou en absence (-Pi) (B, C) de phosphate, récoltées à quatre (J4) (A, B) et huit (J8) (C) jours de culture. Un seul réplicat est représenté pour l'échantillon 27b1 -Pi J8. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport à la souche WT dans la même condition (** $P < 0,001$; * $P < 0,05$).

(D) Résultats du DGTA chez la souche sauvage (WT), cultivée en présence (+Pi) ou en absence (-Pi) de phosphate, récoltée à quatre (J4) et huit (J8) jours de culture. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport à la condition +Pi J4 (** $P < 0,001$; * $P < 0,05$).

Les quantités d'acides gras sont exprimées en nmol/millions de cellules. Le premier chiffre correspond à la somme des carbones des deux acides gras et le deuxième chiffre au nombre total d'insaturations. Les données ont été obtenues par HPLC-MS/MS. Les statistiques ont été réalisées par le test de comparaison deux à deux Kruskal-Wallis.

Concernant les TAG, une augmentation des espèces 48:1, 48:2, 48:3, 50:2 et 50:3 est visible chez les souches mutantes au quatrième jour de la carence (**Figure 23B**). Ces espèces sont riches en acides gras à 16 et 18 carbones et leur augmentation est cohérente avec le profil en acides gras totaux précédemment obtenu (**Figure 20C**). Chez *P. tricornutum*, la néosynthèse des acides gras à chaîne courte est augmentée en situation de carence en Pi pour permettre la production et l'accumulation des TAG. Chez les mutants, ce processus semble être enclenché dès le quatrième jour de la carence : la production accrue de 16:0, 16:1 et 18:1 (**Figure 20C**) coïncide avec l'augmentation des TAG contenant ces mêmes acides gras. Chez la souche sauvage, ce processus est plus tardif et survient au huitième jour de la carence (**Figure 20C et 23C**). Ces résultats confirment une fois de plus que l'activation de la néosynthèse des acides gras déclenchée par la carence en Pi se met en place plus rapidement chez les souches mutantes.

Concernant le DGTA chez la souche sauvage, il est intéressant de noter que sa quantité varie au cours du temps. Très faiblement produit en conditions normales, sa synthèse augmente fortement au quatrième jour de la carence en Pi pour diminuer légèrement au huitième (**Figure 21**). Son profil en acides gras est également très variable bien qu'il soit difficilement interprétable (**Figure 22D**). On peut tout de même noter qu'une diminution des espèces contenant des acides gras à chaîne courte (14 et 16 carbones) a lieu en condition de carence. Cette tendance reflète probablement leur redistribution dans les TAG, bien que cette hypothèse nécessite d'être approfondie.

Concernant les lipides plastidiaux, peu de différences sont visibles (**Figures 24 à 26**). Les profils en acides gras du MGDG (**Figure 24**) et du DGDG (**Figure 25**) sont globalement similaires et suggèrent que l'absence du DGTA n'a pas d'impact majeur sur la synthèse et la composition des glycérolipides du chloroplaste. Les mêmes tendances peuvent être observées dans le profil du SQDG, à l'exception des espèces 32:1 (16:1/16:0) et 36:5 (20:5/16:0) qui semblent être nettement augmentées en condition de carence chez les mutants (**Figure 26**). Ces deux espèces ont d'ailleurs été retrouvées dans le glycérolipidome des gouttelettes lipidiques de *P. tricornutum* (Lupette et al., 2019). Ces résultats pourraient donc indiquer que la contribution du SQDG dans la composition des gouttelettes lipidiques est plus importante chez les mutants, bien que cela reste hypothétique. Au huitième jour de la carence, la proportion de SQDG contenant du 14:0 (30:0 et 30:1) est également légèrement diminuée chez les mutants (**Figure 26C**), ce qui suggère une éventuelle redistribution de cet acide gras dans les TAG.

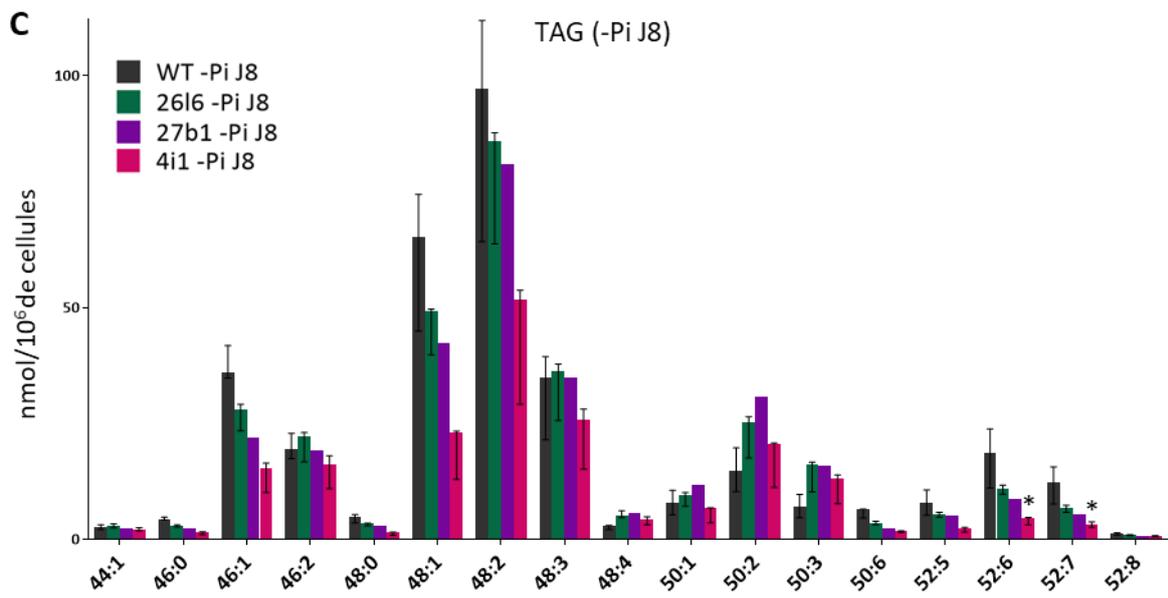
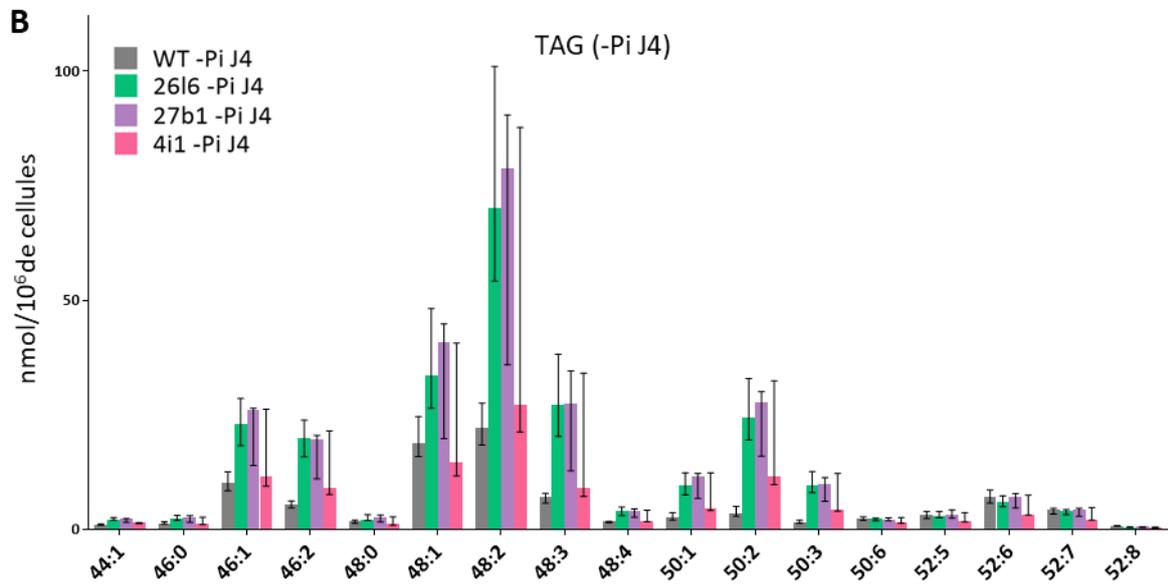
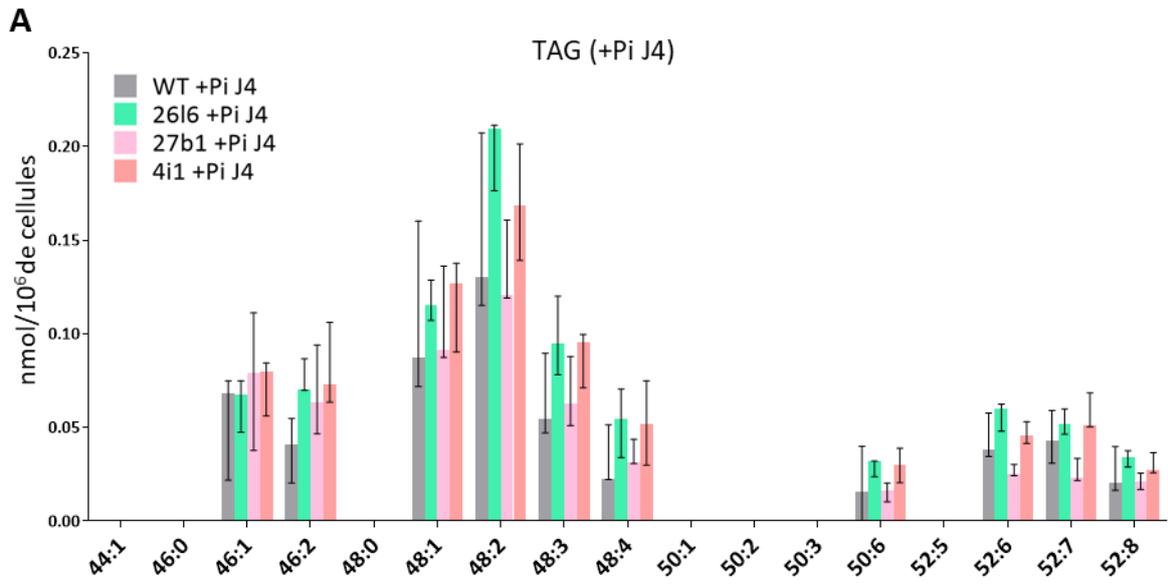


Figure 23. Distribution des acides gras parmi les TAG chez les souches 26I6, 27b1, 4i1 et sauvage (WT), cultivées en présence (+Pi) (A) ou en absence (-Pi) (B, C) de phosphate, récoltées à quatre (J4) (A, B) et huit (J8) (C) jours de culture. Les quantités d'acides gras sont exprimées en nmol/millions de cellules. Le premier chiffre correspond à la somme des carbones des trois acides gras et le deuxième chiffre au nombre total d'insaturations. Les données ont été obtenues par HPLC-MS/MS. Un seul réplicat est représenté pour l'échantillon 27b1 -Pi J8. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport à la souche WT dans la même condition (* $P < 0,05$). Les statistiques ont été réalisées par le test de comparaison deux à deux Kruskal-Wallis.

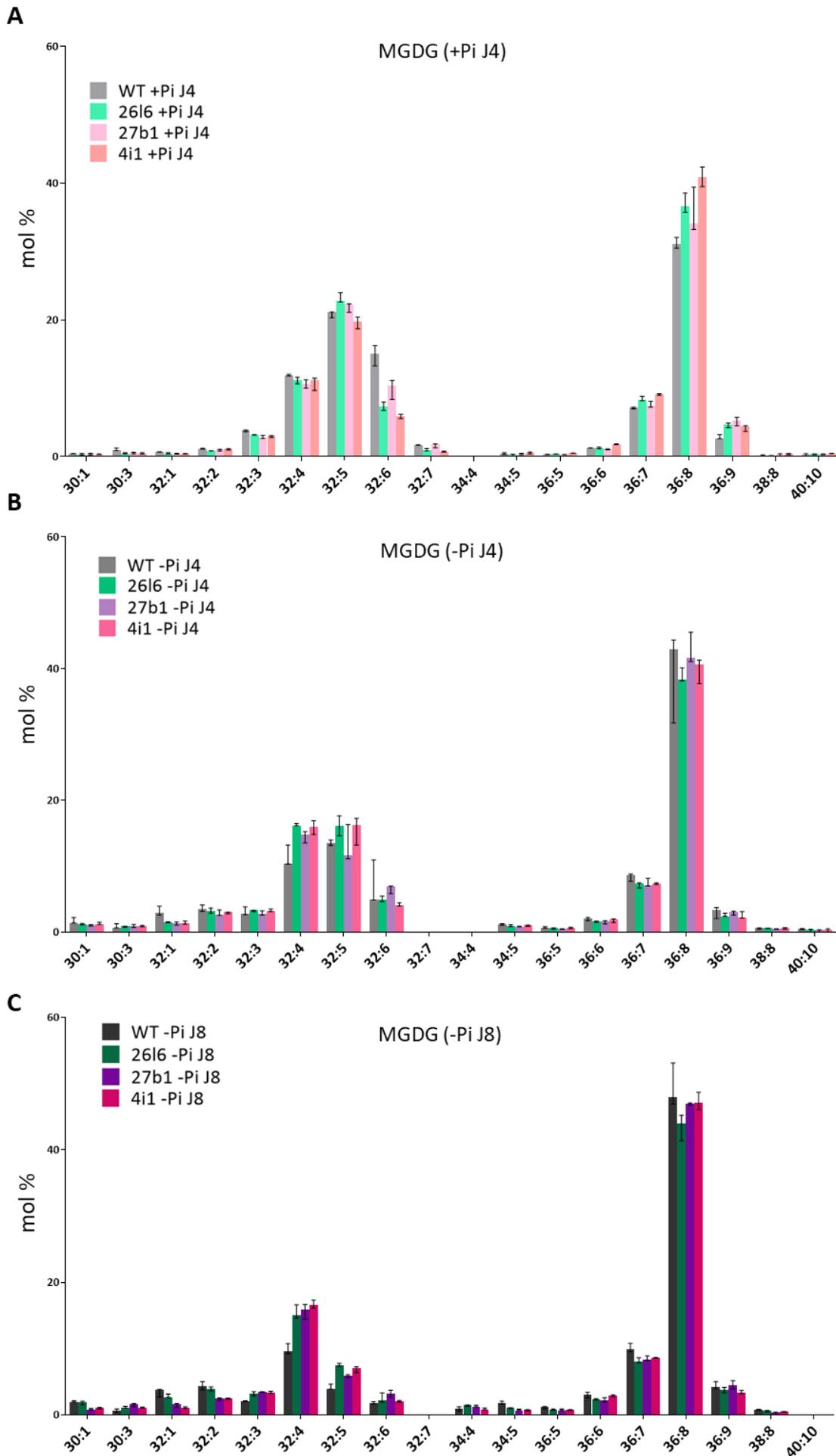


Figure 24. Distribution des acides gras parmi le MGDG chez les souches 26l6, 27b1, 4i1 et sauvage (WT), cultivées en présence (+Pi) (A) ou en absence (-Pi) (B, C) de phosphate, récoltées à quatre (J4) (A, B) et huit (J8) (C) jours de culture. Les proportions d'acides gras sont exprimées en mol %. Le premier chiffre correspond à la somme des carbones des deux acides gras et le deuxième chiffre au nombre total d'insaturations. Les données ont été obtenues par HPLC-MS/MS.

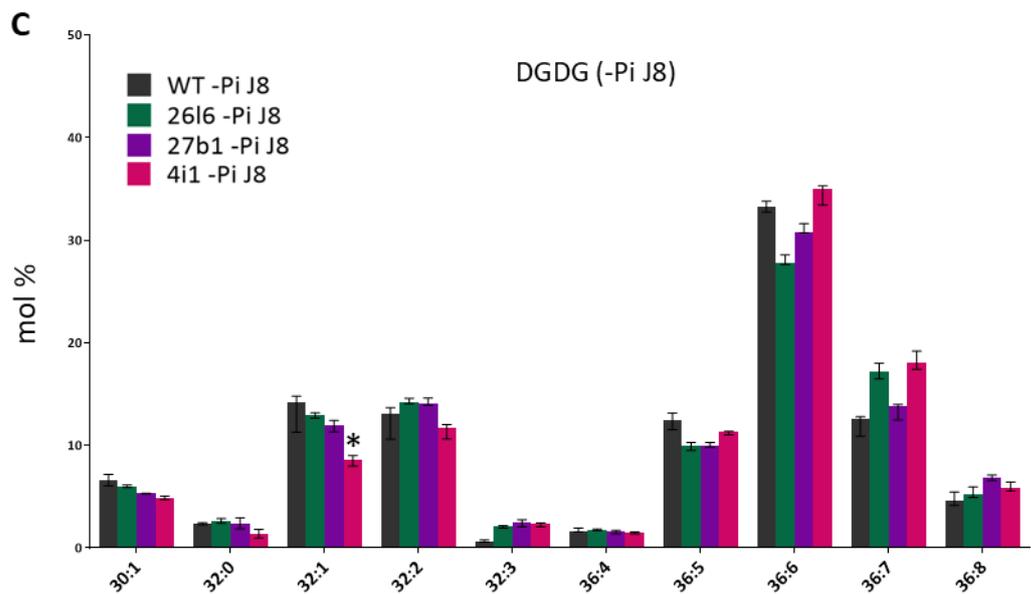
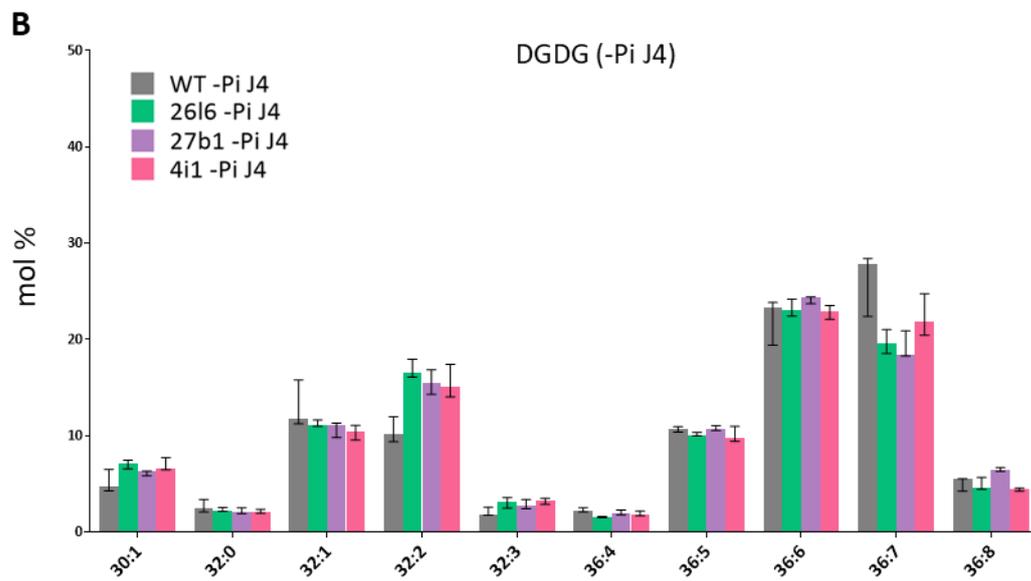
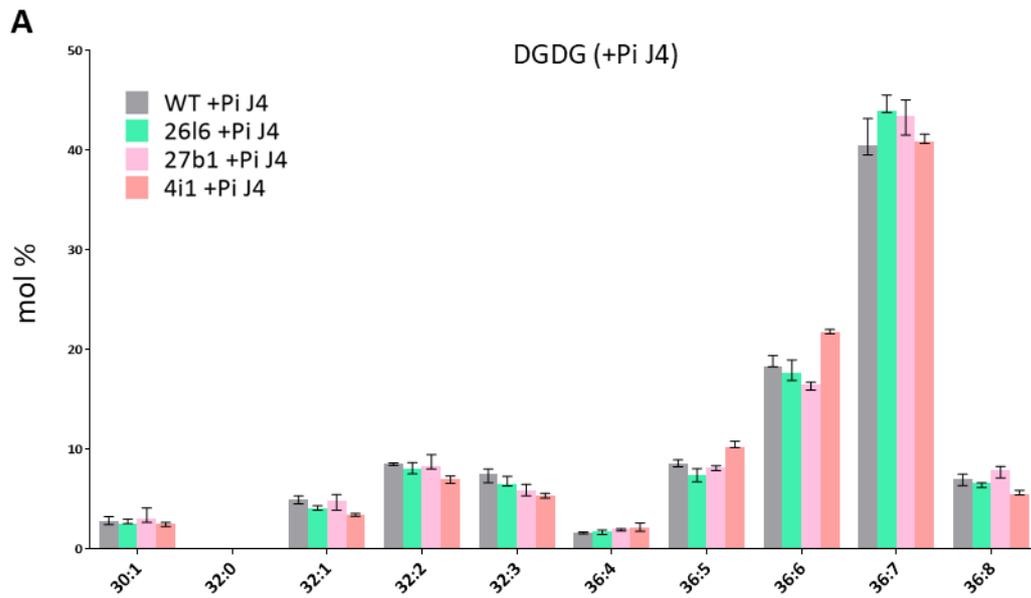


Figure 25. Distribution des acides gras parmi le DGDG chez les souches 26l6, 27b1, 4i1 et sauvage (WT), cultivées en présence (+Pi) (A) ou en absence (-Pi) (B, C) de phosphate, récoltées à quatre (J4) (A, B) et huit (J8) (C) jours de culture. Les proportions d'acides gras sont exprimées en mol %. Le premier chiffre correspond à la somme des carbones des deux acides gras et le deuxième chiffre au nombre total d'insaturations. Les données ont été obtenues par HPLC-MS/MS. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport à la souche WT dans la même condition (* $P < 0,05$). Les statistiques ont été réalisées par le test de comparaison deux à deux Kruskal-Wallis.

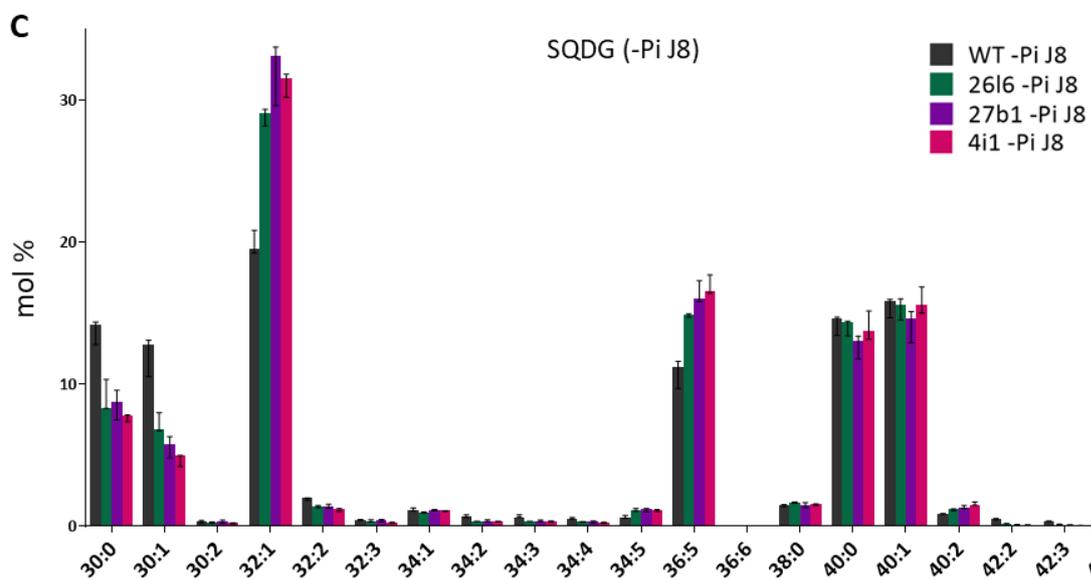
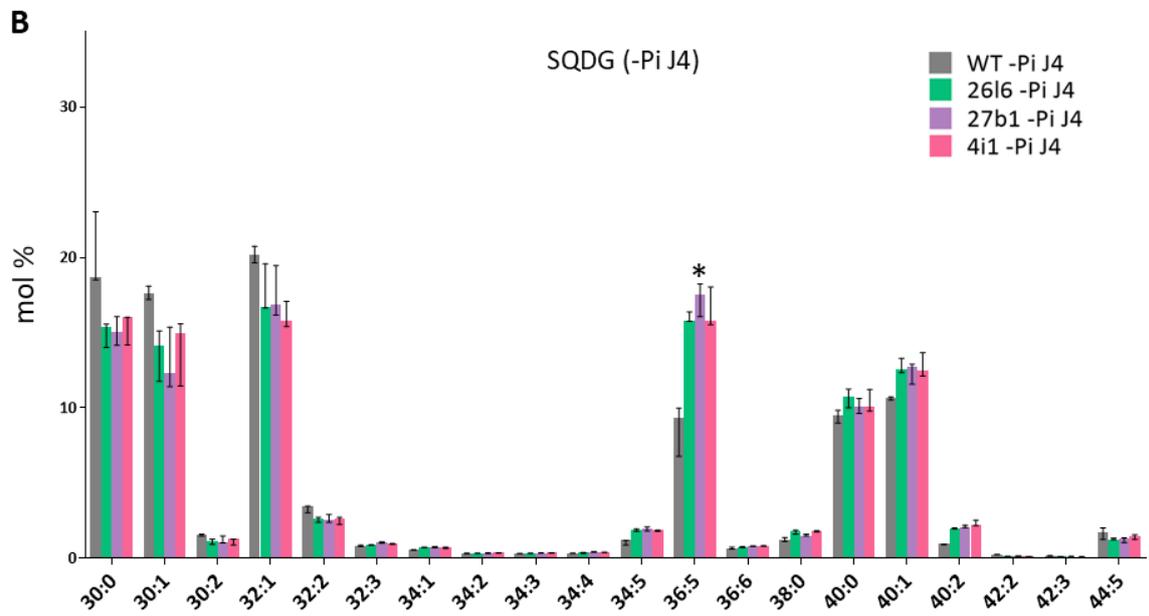
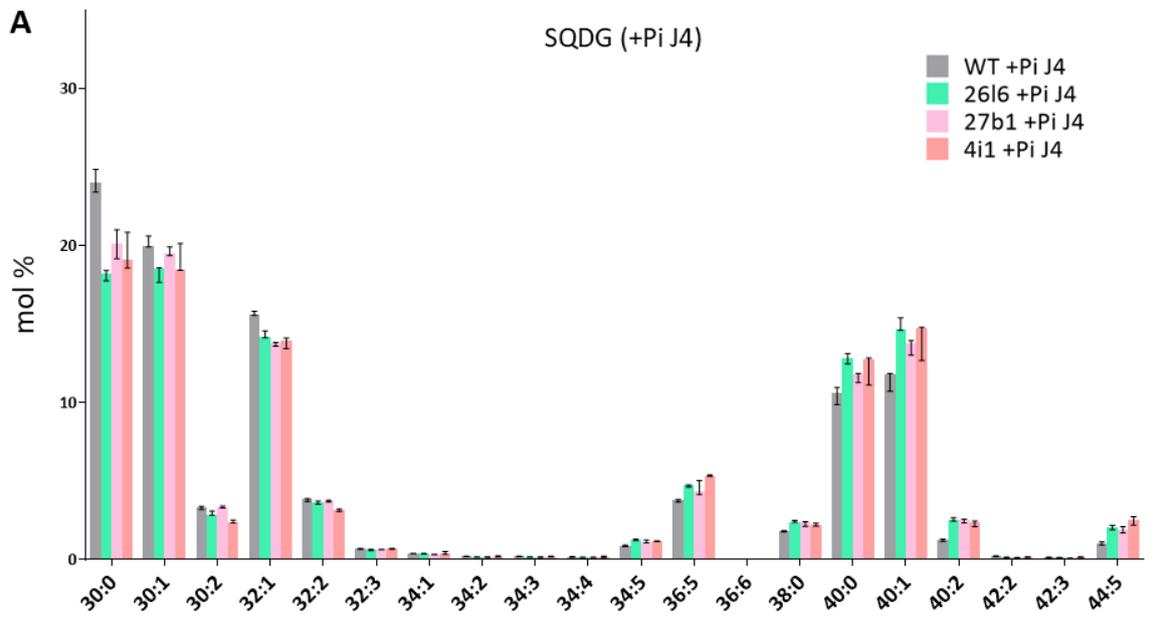


Figure 26. Distribution des acides gras parmi le SQDG chez les souches 26l6, 27b1, 4i1 et sauvage (WT), cultivées en présence (+Pi) (A) ou en absence (-Pi) (B, C) de phosphate, récoltées à quatre (J4) (A, B) et huit (J8) (C) jours de culture. Les proportions d'acides gras sont exprimées en mol %. Le premier chiffre correspond à la somme des carbones des deux acides gras et le deuxième chiffre au nombre total d'insaturations. Les données ont été obtenues par HPLC-MS/MS. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport à la souche WT dans la même condition (* $P < 0,05$). Les statistiques ont été réalisées par le test de comparaison deux à deux Kruskal-Wallis.

3. Conclusion et perspectives

Cet axe d'étude s'est intéressé aux fonctions des bétaines lipides chez la diatomée *P. tricornutum*. L'objectif a été de générer des mutants dépourvus de la synthèse du DGTA afin de mieux comprendre le rôle de ce lipide dans l'adaptation de *P. tricornutum* à la carence en Pi. Le gène responsable de la synthèse du DGTA est encore inconnu chez cet organisme, c'est pourquoi le gène *PtBTA1* a été la cible des mutations générées. En système hétérologue, le gène *PtBTA1* permet la synthèse de DGTS, intermédiaire hypothétique de la voie de synthèse du DGTA (Sato, 1991; Vogel & Eichenberger, 1992). L'analyse des mutants de *P. tricornutum* a montré que la mutation de *PtBTA1* engendrait la suppression de la production du DGTA, confirmant ainsi l'hypothèse selon laquelle le DGTS agit comme intermédiaire dans sa synthèse (Figures 17 et 21).

Chez les organismes eucaryotes, le DGTS est synthétisé en deux étapes : le premier domaine de la protéine PtBTA1 (domaine DUF3419) convertit le DAG en DGHS, lui-même converti en DGTS par le second domaine de la protéine (domaine méthyltransférase) (Figure 16A). Chez le mutant 4i1 analysé en TLC, la présence du premier domaine dans la protéine théoriquement traduite ne semble pas aboutir à la production du DGHS. Les domaines DUF3419 et Méthyltransférase seraient donc tous deux nécessaires à l'activité de PtBTA1, bien que cela reste hypothétique (Figure 17). Des résultats différents ont été observés avec les enzymes BTA1 issus d'organismes procaryotes (Riekhof, Andre, et al., 2005). Chez les bactéries, la synthèse du DGTS est réalisée par deux protéines indépendantes, chacune homologue d'un des deux domaines de la protéine bifonctionnelle retrouvée chez les eucaryotes. La protéine bactérienne BtaA, homologue du domaine DUF3419, a été exprimée seule en système hétérologue chez *E. coli*, une bactérie qui ne possède pas la voie de synthèse du DGTS. L'expérience a cette fois bien abouti à la production du DGHS (Riekhof, Andre, et al., 2005), suggérant qu'il existe une différence notable entre l'activité de l'enzyme BTA1 eucaryote et celle de ses homologues bactériens. Pour approfondir cette hypothèse, il serait intéressant d'exprimer la protéine bactérienne BtaA chez le mutant 4i1. L'analyse des lipides produits permettrait de tester l'activité de l'enzyme bactérienne chez les organismes eucaryotes, apportant ainsi des éléments intéressants à la compréhension de l'évolution de l'enzyme BTA1 chez ces organismes.

Les résultats préliminaires de la caractérisation des mutants de *P. tricornutum* ont apporté des informations intéressantes quant au rôle du DGTA chez cet organisme. En conditions normales, l'absence de ce lipide ne semble pas avoir d'impact sur la croissance ou la morphologie des cellules. Cependant, les mutants ont montré une croissance significativement diminuée en situation de carence en Pi (**Figure 18**). Des résultats similaires ont été obtenus chez *Nannochloropsis oceanica*, une eustigmatophyte productrice de DGTS. Les mutants impactés dans le gène *BTA1* ont en effet montré une croissance altérée uniquement en condition de carence (Murakami et al., 2018). Chez les mutants de *P. tricornutum*, une accumulation plus rapide de gouttelettes lipidiques a également été observée en situation de carence de Pi (**Figures 18 et 19**). Ces premiers résultats indiquent que le DGTA est nécessaire au maintien de la croissance dans cette condition. L'accumulation précoce des gouttelettes lipidiques s'explique probablement par le fait que les mutant dépourvus de DGTA entrent plus rapidement dans une phase de carence, dont l'accumulation de TAG est un marqueur important. En effet, les phospholipides très faiblement dégradés ne peuvent probablement plus fournir une source supplémentaire de Pi à la cellule, accélérant ainsi l'atteinte du seuil limite de Pi intracellulaire et le déclenchement de la réponse lipidique. Une analyse morphologique plus poussée serait intéressante à réaliser pour approfondir l'étude de ces mutants. Les cellules pourraient être observées par microscopie électronique afin d'examiner plus en détail l'impact de l'absence du DGTA sur l'architecture des membranes. Un marquage des cellules au rouge de Nil, un marqueur des gouttelettes lipidiques, pourrait également être réalisé afin de quantifier l'accumulation de ces dernières et de mesurer leur apparition au cours du temps.

L'analyse du profil lipidique des mutants a permis d'apporter des éléments supplémentaires à la compréhension des mécanismes d'adaptation de *P. tricornutum* en réponse à la carence en Pi. En conditions normales, les cellules mutantes ont montré une quantité totale d'acides gras légèrement inférieure à celle des cellules sauvages (**Figure 20A**). En revanche, la quantité de PC est largement supérieure chez les souches mutantes par rapport à celle retrouvée chez la souche sauvage, indiquant que la perte du DGTA est largement compensée par une augmentation de la synthèse de PC (**Figure 21**). Ces résultats consolident ainsi l'hypothèse de l'interchangeabilité entre ces deux lipides, souvent décrite dans la littérature. Il est intéressant de noter que la quantité des autres phospholipides n'est que très légèrement altérée ; la quantité de PE ne semble pratiquement pas varier tandis que la faible augmentation du niveau de PI reste bien moins importante que celle observée pour la PC. En revanche, c'est la PE qui semble compenser l'absence de DGTS chez les mutants de *N. oceanica*, tandis que les niveaux de PC ne restent que faiblement altérés (Murakami et al., 2018).

En condition de carence de Pi, la dégradation des phospholipides observée chez la souche sauvage n'a pas lieu chez les souches mutantes (**Figure 21**). L'absence de DGTA semble nettement ralentir la dégradation des phospholipides, probablement pour préserver l'intégrité des membranes extraplastidiales. La synthèse du DGTA semble donc nécessaire à la dégradation des phospholipides, confirmant une fois de plus l'importance de ce lipide dans l'adaptation à la carence en Pi. Il serait intéressant d'identifier les mécanismes sous-jacents au blocage de la dégradation des phospholipides observé chez les mutants en carence de Pi. Des analyses transcriptionnelles pourraient être menées chez ces derniers afin d'identifier d'éventuels gènes exprimés de façon différentielle par rapport à la souche sauvage. Une RT-qPCR pourrait par exemple être réalisée sur quelques gènes cibles de phospholipases impliquées dans la dégradation des phospholipides. Cette expérience permettrait ainsi d'identifier les éventuels régulateurs impliqués dans ces mécanismes.

L'analyse des espèces lipidiques a également permis de mieux comprendre la mise en place de la carence chez *P. tricornutum*. Dès le quatrième jour de la carence, la synthèse des acides gras à 16 et 18 carbones semble être augmentée chez les mutants (**Figure 20C**) et coïncide avec le profil en acides gras des TAG accumulés chez ces derniers dans la même condition (**Figure 23B**). Ce processus semble se mettre en place plus tardivement chez la souche sauvage, comme le rapportent les précédentes études qui ont été réalisées au treizième jour de la carence (Abida et al., 2015). Les cellules dépourvues de la synthèse du DGTA semblent donc déclencher leur réponse à la carence de Pi de manière beaucoup plus rapide. Ce phénomène est probablement lié au défaut de recyclage du Pi chez les mutants. Des cinétiques plus approfondies en carence de Pi pourraient être réalisées afin de mieux caractériser la temporalité de la réponse chez les différentes souches. Un suivi journalier pourrait par exemple être effectué pour déterminer précisément les points d'apparition et d'accumulation des TAG chez les mutants et la souche sauvage. Cette cinétique serait également intéressante pour étudier de manière plus approfondie les variations de la quantité de DGTA produite chez la souche sauvage.

Ainsi, la caractérisation des mutants de *P. tricornutum* semble confirmer le rôle essentiel du DGTA en tant que substitut des phospholipides en situation de carence de Pi. Grâce à cette substitution, les cellules peuvent remobiliser des réserves supplémentaires de Pi, prolonger leur adaptation au stress nutritif et maintenir leur croissance sur une plus longue période. Chez les souches mutantes, l'absence de DGTA semble impacter très lourdement le processus de dégradation des phospholipides. La suppression du DGTA conduit également à l'accélération de l'entrée des cellules en phase de stress nutritif ainsi qu'à l'accumulation subséquente des gouttelettes lipidiques. Les effets semblent se limiter aux membranes extraplastidiales car aucun impact notable n'a été relevé sur les lipides plastidiaux, mise à part la légère modification de la composition du SQDG et le faible ralentissement

de la dégradation du PG. Ces résultats sont préliminaires et nécessitent d'être validés par d'autres répétitions d'expériences. Ici, seulement trois réplicats biologiques de culture sont représentés sur les analyses lipidiques et les suivis de croissance ; au moins trois répétitions supplémentaires devront être effectuées pour confirmer l'ensemble des résultats obtenus et éliminer les éventuels biais liés aux conditions de culture.

Conclusion générale
et
Perspectives du projet

Conclusion générale et perspectives du projet

Ce projet d'étude s'est intéressé à l'adaptation des organismes photosynthétiques à la carence en Pi, l'un des stress nutritifs les plus fréquemment rencontrés dans les milieux terrestres et aquatiques. Essentiel à l'ensemble des processus biologiques, le Pi fait partie intégrante du métabolisme des organismes et sa limitation impacte très lourdement leur croissance et leur développement. Au cours de l'évolution, les organismes ont développé différentes stratégies d'adaptation afin de lutter efficacement contre ce stress. Ces mécanismes adaptatifs varient selon les espèces mais reposent globalement sur des principes communs, à savoir une gestion optimisée du transport et du stockage du Pi intracellulaire ainsi qu'un remodelage conséquent des lipides membranaires. Ce dernier point fait l'objet de ce projet de thèse ; l'objectif a été d'étudier et de comparer le remodelage lipidique mis en place lors de la carence en Pi chez deux organismes photosynthétiques relativement éloignés : les microalgues dérivées d'endosymbiose secondaire et les plantes terrestres.

Chez les organismes photosynthétiques, le remodelage lipidique mis en place lors de la carence en Pi implique la dégradation des phospholipides ; des glycérolipides phosphatés localisés au niveau des membranes extraplastidiales. Ces derniers sont dégradés afin de fournir une source de Pi supplémentaire à la cellule, lui permettant ainsi de maintenir son activité. Les phospholipides dégradés sont alors remplacés par une autre classe de glycérolipides (non phosphatés) dans le but de maintenir l'intégrité et la structure des membranes. Chez les organismes aquatiques et en particulier les microalgues, ce remplacement est en partie assurée par les BL ; des glycérolipides non phosphatés qui se révèlent particulièrement efficaces pour se substituer aux phospholipides au sein des membranes extraplastidiales lors de la carence en Pi. Chez certaines espèces telles que la diatomée *P. tricornutum*, les BL peuvent même remplacer l'intégralité des phospholipides dans les membranes. Cependant, la synthèse des BL a progressivement disparu au cours de l'évolution des plantes, amenant ces dernières à modifier leur stratégie d'adaptation face au nouvel environnement terrestre. Chez les plantes à graines, le remplacement des phospholipides extraplastidiaux est assuré par les galactolipides exportés depuis le chloroplaste. Le DGDG permet notamment de remplacer une partie des phospholipides dans les membranes, bien que ce remodelage concerne seulement une portion limitée des phospholipides dégradés. Le DGDG et les phospholipides n'ont pas les mêmes propriétés biophysiques, ce qui les rend peu compatibles au sein d'une même membrane (Kanduc et al., 2017). A l'inverse, des études ont montré que les BL et les phospholipides avaient des propriétés physiques similaires, du moins chez les organismes aquatiques (Bolik et al., 2023). Chez ces derniers, les BL et les phospholipides semblent en effet se substituer l'un à l'autre dans les membranes. Cette hypothèse ne semble pas s'appliquer aux organismes terrestres chez lesquels les BL ont été définitivement perdus

et remplacés par les phospholipides. Le premier axe de ce projet a été d'approfondir cette hypothèse par des expériences *in vivo* en générant des plantes productrices de BL. L'objectif a été d'étudier l'impact de ces derniers sur le phénotype et l'adaptation des plantes à la carence en Pi.

1. Etude de la production du DGTS chez les plantes supérieures

Le DGTS est le seul bétaine lipide dont la voie de biosynthèse est entièrement connue. Il est synthétisé à partir d'un précurseur DAG par l'enzyme BTA1, caractérisée chez plusieurs microalgues dont *C. reinhardtii* et *Nannochloropsis oceanica* (Murakami et al., 2018; Oishi et al., 2022; Riekhof et al., 2005). Des test préliminaires d'expression transitoire de BTA1 ont été réalisés en système hétérologue chez la plante *N. benthamiana*. L'expression des différentes enzymes BTA1 a abouti à la production de DGTS dans les feuilles infiltrées, prouvant ainsi que les plantes sont toujours capables de synthétiser les BL grâce à la simple expression du gène. La disparition du DGTS chez les plantes supérieures s'expliquerait donc uniquement par l'absence de *BTA1* dans leur génome.

L'enzyme BTA1 issue de la microalgue *Microchloropsis gaditana* (MgBTA1) a été choisie pour les transformations stables d'*A. thaliana*. De premières tentatives ont été effectuées avec l'utilisation du promoteur constitutif 35S, sans aucun succès de transformation. D'autres essais ont été réalisés avec le promoteur pMGD3, un promoteur inductible à la carence en Pi. Les lignées obtenues de ces transformations ont donc été analysées. Les cals et les plantules générés ont été cultivés en condition de carence en Pi afin d'y induire la synthèse de DGTS. Ce dernier n'a été produit qu'en faible quantité, ne dépassant pas 5 % des glycérolipides totaux. Aucun impact majeur n'a été relevé sur les quantités des autres glycérolipides produits, suggérant que la production de DGTS n'a pas d'effet sur le remodelage lipidique déclenché en carence de Pi. De plus, aucune modification visible du phénotype des plantules n'a été relevée dans cette condition. Cependant, ce faible impact pourrait être dû à la production très limitée de DGTS dans les cals et les plantules analysés. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la faible disponibilité du DAG dans les cellules. Chez les plantes soumises à une carence en Pi, l'hydrolyse de la PC génère la libération d'un squelette DAG, probablement redirigé vers le chloroplaste pour participer à la synthèse du DGDG (Jouhet et al., 2003; Nakamura et al., 2009). Bien que le lieu de libération du DAG soit toujours inconnu, il est possible que son transfert vers les membranes chloroplastiques le rende inaccessible à l'enzyme MgBTA1.

Les échecs de transformation d'*A. thaliana* avec le promoteur 35S ont montré qu'aucune graine ne pouvait être produite lorsque le DGTS était exprimé de manière constitutive. Ces résultats montrent que le DGTS est probablement toxique pour les membranes de la graine, une structure

particulièrement déshydratée par rapport au reste de l'appareil végétatif de la plante. L'hypothèse émise par (Bolik et al., 2023) concernant l'incompatibilité entre le DGTS et la PC dans les membranes à pressions osmotiques variables (ce qui est le cas des organismes terrestres) est en accord avec ces résultats. De plus, plusieurs études ont montré que le DGTS était dégradé pendant les périodes de sécheresse chez certaines plantes primitives (Guschina et al., 2002; Rozenstvet, 2004; Rozenstvet et al., 2001), suggérant encore une fois que le DGTS est délétère chez les organismes évoluant dans un environnement limité en eau. Comme évoqué précédemment, des lignées stables d'*A. thaliana* exprimant le gène *MgBTA1* sous le contrôle d'un promoteur inductible au dexaméthasone ont été générées en interne au laboratoire LPCV. Ce système aura l'avantage d'induire l'expression de *MgBTA1* de manière ciblée dans l'espace et le temps. L'objectif sera alors d'étudier l'impact spécifique de la production du DGTS sur la formation de la graine et la tolérance de la plante face à la sécheresse. Ces expériences permettraient de confirmer l'impact négatif du DGTS chez les plantes dans ces conditions, apportant ainsi de nouveaux éléments cruciaux à la compréhension de l'évolution et l'adaptation des plantes supérieures à l'environnement terrestre.

Ainsi, les plantes terrestres semblent avoir développé des stratégies d'adaptation spécifiquement liées aux conditions de leur milieu. Bien que partiellement dégradés en conditions de carence en Pi, les phospholipides demeurent les constituants majoritaires des membranes extraplastidiales. Dans les lignées transformées d'*A. thaliana*, le DGTS n'est produit qu'en faible quantité et la PC reste largement majoritaire parmi les phospholipides extraplastidiaux. Comme évoqué précédemment, la présence du DGTS dans les membranes semble très peu compatible avec celle de la PC. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'impact de la production du DGTS lorsque la synthèse de PC est amoindrie. Des mutants d'*A. thaliana* impactés dans la synthèse de PC ont été générés dans une étude de 2019 (Liu et al., 2019). Les trois isoformes PMT1, PMT2 et PMT3 (Phospho-base *N*-Méthyltransférase 1, 2, 3) ont été la cible des mutations générées. Ces enzymes sont responsables de la production de phosphocholine, précurseur indispensable à la synthèse de PC (*cf.* Introduction I.). Bien que les doubles mutants *pmt1-pmt2* puissent encore synthétiser la PC, leur croissance et leur développement ont été fortement altérés. La génération des triples mutants *pmt1-pmt2-pmt3*, totalement dépourvus de la synthèse de PC, s'est quant à elle révélée létale pour les plantules (Liu et al., 2019). Ces résultats prouvent ainsi le rôle crucial de la PC chez *A. thaliana*. Il serait intéressant d'induire la production de DGTS chez les triples mutants *pmt1-pmt2-pmt3* afin de voir si une éventuelle complémentation est possible. Les triples mutants pourraient être transformés avec le gène *MgBTA1* placé sous le contrôle du promoteur inductible au dexaméthasone. Les graines issues des plantes transformées pourraient ensuite être semées sur un milieu contenant du dexaméthasone afin d'induire l'expression du DGTS et d'analyser la croissance et la survie des plantules. Cette expérience apporterait des éléments

intéressants quant à la capacité du DGTS à se substituer à la PC lorsque cette dernière n'est pas produite.

La plante *N. benthamiana* a également été utilisée afin d'induire la synthèse transitoire de DGTS dans ses feuilles. Cette méthode a l'avantage de générer la production d'une grande quantité de DGTS, contrairement au système d'expression stable chez *A. thaliana*. Les enzymes BTA1 issues de *P. tricornutum* (PtBTA1) et de *M. gaditana* ont donc été testées sur ce modèle. L'enzyme MgBTA1 s'est révélée particulièrement efficace, avec une production de DGTS représentant jusqu'à 20 % des glycérolipides totaux produits. Cette production massive n'a eu que très peu d'impact sur la synthèse et la composition des autres glycérolipides. Le DGTS semble s'être accumulé dans une prolifération de membranes de réticulum endoplasmique, sans autre impact apparent dans la cellule. Une légère diminution de l'efficacité photosynthétique a été observée, bien que cet aspect nécessite d'être approfondi. Cette éventuelle diminution de la photosynthèse ne semble pas être liée à la présence du DGTS dans le chloroplaste car il n'y a pas été détecté. Au vu de l'ensemble de ces résultats, il semblerait que le DGTS remplisse le rôle structural de la PC au niveau des feuilles, structures bien hydratées de la plante. Il serait intéressant de savoir s'il peut entrer dans la composition d'autres membranes extraplastidiales. Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, le DGTS est présent dans toutes les membranes extraplastidiales (Li-Beisson et al., 2015), à l'instar de la PC chez les plantes. Les expériences de microscopie confocale et électronique suggèrent fortement la présence du DGTS dans le réticulum endoplasmique, son lieu de synthèse supposé. Le DGTS pourrait éventuellement être transporté vers d'autres organelles telles que les mitochondries. Une purification de ces dernières suivie d'une analyse lipidique permettrait de répondre à cette question. Des expériences d'immunodétection permettraient également d'apporter des informations intéressantes quant à la localisation intracellulaire précise du DGTS. Des cultures cellulaires d'*A. thaliana* peuvent notamment être utilisées pour marquer par immunofluorescence les différents compartiments cellulaires grâce à la fixation d'anticorps spécifiques (Jouhet et al., 2004). Les cellules pourraient par exemple être doublement marquées avec un anticorps anti-DGTS et un anticorps spécifique des mitochondries pour détecter une éventuelle co-localisation des signaux de fluorescence. Cependant, une production préalable d'anticorps anti-DGTS serait nécessaire à la réalisation de ces expériences. Des tentatives ont déjà été effectuées en interne au laboratoire LPCV. Des anticorps suffisamment sensibles ont été obtenus mais ces derniers ont perdu de leur spécificité en raison de leur cryoconservation. Une nouvelle production serait donc nécessaire afin de réaliser ce marquage. De plus, les lignées transformées d'*A. thaliana* n'ont produit qu'une faible quantité de DGTS, probablement insuffisante pour être détectée par immunofluorescence. Les lignées transformées avec le promoteur inductible

au dexaméthasone pourraient potentiellement produire des niveaux plus élevés de DGTS, rendant ainsi possible la réalisation de ces expériences d'immunodétection.

2. Etude du rôle des bétaine lipides chez la microalgues *P. tricornutum*

Le second axe du projet a été d'étudier la synthèse et le rôle du DGTA chez la diatomée *P. tricornutum*. Bien que la synthèse de ce bétaine lipide ne soit pas entièrement résolue, le gène *BTA1* semble y jouer un rôle essentiel. En effet, les mutants KO générés au cours de cette étude ont permis de confirmer l'implication de *BTA1* dans la production du DGTA. Les analyses lipidiques ont montré que la mutation du gène aboutissait à la disparition complète de ce lipide, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle le DGTS agit comme intermédiaire dans sa synthèse. Pour rappel, le DGTS et le DGTA sont des isomères structuraux ; le DGTA serait obtenu par l'action d'une ou plusieurs enzyme(s) responsable(s) du transfert du groupe carboxyle d'un carbone à l'autre au niveau du squelette glycérol (Sato, 1991; Vogel & Eichenberger, 1992). L'objectif initial de ce projet était de valider cette hypothèse en tentant d'identifier le ou les gène(s) responsable(s) de cette conversion. Pour cela, des gènes candidats ont été sélectionnés à partir du transcriptome de *P. tricornutum* en situation de carence en Pi (Cruz de Carvalho et al., 2016). La sélection a été effectuée sur les gènes qui présentaient une activité carboxylase et dont le profil d'expression était similaire à celui du gène *PtBTA1* (**tableau 1**). Les gènes candidats ont été clonés à partir d'ADNc de *P. tricornutum* et exprimés transitoirement avec le gène *PtBTA1* par agroinfiltration dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* pour détecter l'éventuelle production de DGTA. Le DGTA n'a pas été détecté sur les analyses de TLC, quelles que soient les combinaisons d'enzymes testées (résultats non montrés dans ce manuscrit). Une nouvelle recherche bio-informatique a été réalisée afin d'identifier de nouveaux gènes candidats. De nouveaux critères plus sélectifs ont été pris en compte pour cette nouvelle analyse ; les gènes sélectionnés devaient présenter un coefficient de co-expression avec *PtBTA1* plus élevé et être conservés chez les organismes producteurs de DGTA. L'analyse a généré une très grande liste de gènes, assez bien décrits et conservés chez les organismes pour la majorité. Quelques gènes de fonction inconnue figuraient également parmi les résultats mais correspondaient à des protéines très courtes et donc peu compatibles avec une activité de carboxylation ou décarboxylation. Au vu de ces résultats, il a semblé difficile et incertain de retenir l'expérience de co-expression de *PtBTA1* avec ces nombreux gène candidats (résultats non montrés dans ce manuscrit).

Identifiant du gène	Identifiant de la protéine	domaine Pfam	Activité
Phatr3_J47025	XP_002181328.1	Alanine racemase C-terminal domain-like	décarboxylase
Phatr3_J3362	XP_002177188.1	Adenosylmethionine decarboxylase	décarboxylase
Phatr3_J45886	XP_002176492.1	Carboxyl transferase domain	carboxylase

Tableau 1 : Liste des gènes candidats testés pour l'identification de la DGTA synthase chez *P. tricornutum*. Le nom du domaine catalytique de la protéine a été identifié par la base de données Pfam. L'activité de carboxylation ou de décarboxylation de la protéine est également indiqué.

Grâce à l'obtention des mutants KO de *P. tricornutum*, de nouvelles approches pourraient être employées afin de tenter l'identification du gène responsable de la synthèse du DGTA. Un vecteur de surexpression du gène *PtBTA1* couplé à la GFP est en cours de construction afin de tenter de répondre à cet objectif. Le but est de surexprimer *PtBTA1-GFP* dans une des souches mutantes générées afin de compléter le mutant en assurant la production de DGTA et d'identifier les partenaires de la protéine PtBTA1. Grâce au tag GFP fusionné à la protéine, une expérience de co-immunoprécipitation permettrait de récupérer les protéines interagissant avec PtBTA1. Parmi ces protéines, l'enzyme responsable de la conversion du DGTS en DGTA pourrait être présente. En effet, le DGTS n'est pas détecté chez *P. tricornutum*, ce qui indique que la production du DGTA est couplée à la synthèse du DGTS. Afin de réduire la liste des protéines interactantes obtenues par l'expérience d'immunoprécipitation et de faciliter l'identification des DGTA synthases potentielles, une recherche d'activités de décarboxylation et/ou carboxylation pourrait être réalisée, comme cela avait été fait pour les analyses de co-expression. Les protéines candidates pourraient alors être testées en système hétérologue chez *N. benthamiana*. PtBTA1 serait co-exprimée transitoirement avec la protéine candidate ; les lipides produits seraient extraits et analysés afin de détecter l'éventuelle présence de DGTA, validant ainsi la voie de synthèse complète du DGTA.

Les résultats préliminaires de la caractérisation des mutants de *P. tricornutum* ont permis d'obtenir une meilleure compréhension des fonctions du DGTA, notamment dans le cadre de l'adaptation à la carence en Pi. En conditions optimales, l'absence du DGTA ne semble pas avoir d'effet majeur sur la croissance et la morphologie des cellules ; ces deux aspects étaient peu variables entre les souches mutantes et la souche sauvage. En revanche, des différences notables ont été relevées concernant les niveaux de PC. Les mutants ont en effet montré une augmentation nette de la quantité de PC par rapport à la souche sauvage en conditions normales, sans autre effet majeur sur le reste des glycérolipides. Ce résultat met clairement en évidence le caractère interchangeable de la PC et du DGTA. Cependant, le DGTA s'est révélé essentiel à la croissance et au métabolisme de *P. tricornutum* en condition de carence en Pi. Dans cette situation, les mutants dépourvus de DGTA ont présenté une

croissance amoindrie et une accumulation plus rapide des gouttelettes lipidiques. Le remodelage lipidique s'en est également retrouvé modifié. Contrairement à la souche sauvage, les phospholipides n'ont pas été dégradés chez les mutants. Ces résultats pourraient suggérer que la présence du DGTA dans les membranes est nécessaire à l'hydrolyse des phospholipides enclenchée par la carence en Pi. Chez les mutants, les TAG se sont accumulés plus rapidement que chez la souche sauvage, illustrant probablement l'entrée précoce des cellules en condition de stress nutritif. L'ensemble de ces résultats illustre ainsi l'importance primordiale du DGTA dans l'adaptation des cellules à la carence en Pi.

Il serait intéressant d'élargir cette étude à d'autres organismes producteurs de bétaine lipides. Le projet initial de cette thèse était de générer des mutants KO chez la microalgue modèle *Microchloropsis gaditana*, une eustigmatophyte productrice de DGTS. Ce projet a été abandonné en raison de l'échec des transformations. Toutefois, si ces mutants avaient pu être générés, il aurait été intéressant de comparer leur analyse avec celle des mutants de *P. tricornutum*. Chez *M. gaditana*, la quantité de DGTS est supérieure à la quantité de DGTA retrouvée chez *P. tricornutum*, et cette tendance est inversée concernant les quantités de PC (Cañavate et al., 2017; Jouhet et al., 2017). Etant naturellement plus riche en BL, les mutants de *M. gaditana* auraient possiblement répondu de manière différente à l'absence de DGTS, bien que cela reste hypothétique. Chez *M. gaditana*, le DGTS est impliqué dans la voie Ω en tant que fournisseur de 20:5 pour la synthèse des galactolipides (Billey et al., 2021). Chez les mutants de *P. tricornutum* générés dans cette étude, la voie Ω ne semble pas être impactée ; les galactolipides sont bien préservés lorsque le DGTA n'est pas produit. En revanche, la PC semble être enrichie en 20:5 chez les mutants par rapport à la souche sauvage, témoignant d'un possible rôle de la PC dans la distribution de 20:5 pour la synthèse des lipides plastidiaux. Etant donné que ce mécanisme est inhabituel chez la PC, le transfert du 20:5 est peut-être ralenti et explique probablement l'accumulation de cette espèce chez la PC. Bien que cela reste hypothétique, il serait intéressant d'analyser l'impact de l'absence du DGTS sur la voie Ω chez *M. gaditana* pour voir si des mécanismes similaires se produisent.

Dans une étude réalisée chez *Nannochloropsis oceanica*, une espèce très proche de *M. gaditana*, des souches mutantes impactées dans la synthèse du DGTS ont également été générées. Chez *N. oceanica*, il existe deux isoformes de la protéine BTA1 : l'une contient les deux domaines catalytiques (BTA1L pour « long ») et l'autre contient seulement le domaine méthyltransférase (BTA1S pour « short »). L'étude a révélé que les isoformes BTA1L et BTA1S participaient toutes les deux à la synthèse du DGTS (Murakami et al., 2018). Lorsque le domaine méthyltransférase de la BTA1L est remplacé par celui de la BTA1S, l'enzyme est toujours fonctionnelle et capable de synthétiser le DGTS. Ces résultats suggèrent que le domaine méthyltransférase de la BTA1S est bien actif et indépendant de l'activité de

l'isoforme BTA1L qui possède les deux domaines. Chez le mutant 4i1 de *P. tricornutum* généré dans cette étude, la suppression du domaine méthyltransférase semble inactiver la fonctionnalité de l'enzyme. Bien que plusieurs raisons puissent expliquer ce phénomène, il est possible que la protéine tronquée ne puisse pas adopter une bonne conformation, la rendant ainsi inactive et incapable de produire l'intermédiaire DGHS. Chez *N. oceanica*, l'isoforme BTA1S est constituée de régions non catalytiques constituées de 70 à 90 acides aminés et situées en amont et en aval du domaine méthyltransférase (Murakami et al., 2018). Ces régions pourraient possiblement être nécessaires à l'adoption de la bonne conformation de l'enzyme.

La caractérisation des mutants de *P. tricornutum* a mis en évidence la capacité de la PC à se substituer au DGTA. Afin d'approfondir l'étude de la relation entre ces deux lipides, il serait intéressant d'étudier également l'impact de l'absence de la PC chez cet organisme. Le projet initial de cette thèse était de générer des mutants impactés dans la synthèse de ce lipide, en plus de ceux qui sont impactés dans la synthèse du DGTA. Le gène *PEAMT* (Phatr3_J39710) a été la cible des mutations. Chez les plantes, son homologue est responsable de la production de phosphocholine, précurseur nécessaire à la synthèse de PC. Des souches KO pour le gène *PEAMT* ont donc été générées et analysées en TLC, mais les résultats ont montré que la synthèse de PC n'y était pas altérée (résultats non montrés dans ce manuscrit). Il existe donc des incertitudes quant à la voie de synthèse de la PC chez *P. tricornutum*. Dans l'étude réalisée chez *N. oceanica*, des mutants KO pour le gène *CCT1* (CTP:phosphocholine cytidylyltransferase 1) ont montré des niveaux de PC significativement réduits par rapport à la souche sauvage (Murakami et al., 2018). L'enzyme CCT1 est responsable de la conversion de la phosphocholine en CDP-Choline ; étape qui intervient juste après la génération de phosphocholine par la *PEAMT*. Chez *P. tricornutum*, deux homologues putatifs du gène *CCT* (Phatr3_J40163 et Phatr3_J44584) ont été identifiés. Ces gènes possèdent également une activité supposée dans la production de CDP-éthanolamine, le précurseur de la PE. Ces gènes sont donc potentiellement impliqués dans la synthèse de la PC et de la PE. Il serait tout de même intéressant d'obtenir des mutants KO pour ces deux gènes afin de mieux comprendre la voie de synthèse de ces phospholipides chez *P. tricornutum*. Cette expérience permettrait également d'étudier l'impact de ces mutations sur les niveaux de DGTA produits. Chez les mutants *cct1* de *N. oceanica*, il est intéressant de noter que la diminution de la PC génère une légère augmentation de la synthèse du DGTS. Bien que la PC représente encore le phospholipide extraplastidial le plus abondant, il semble quand même y avoir un impact sur le niveau de DGTS (Murakami et al., 2018). Ces résultats montrent une fois de plus la forte relation qui existe entre la PC et le DGTS. La synthèse de ces deux lipides semble être liée et régulée de manière très fine ; une simple diminution de l'un génère une augmentation de l'autre.

Enfin, il serait également intéressant d'approfondir les connaissances du métabolisme lipidique de *P. tricornutum* en situation de carence en Pi par l'identification des lipases impliquées dans la dégradation des phospholipides. Des analyses transcriptomiques pourraient être réalisées sur la souche sauvage et les souches mutantes générées en conditions normales et en conditions de carence en Pi. Par la comparaison des transcriptomes de la souche sauvage avec ceux des souches mutantes, les gènes différentiellement exprimés en condition de carence en Pi pourraient correspondre aux lipases impliquées dans la dégradation des phospholipides observée chez la souche sauvage.

3. Synthèse générale

Ce projet de thèse s'est intéressé aux rôles et à l'évolution des BL chez les organismes. L'objectif a été de mieux comprendre leurs fonctions chez les microalgues et d'étudier l'impact de leur production chez les plantes supérieures. Chez la microalgue *P. tricornutum*, l'absence du DGTA a généré une augmentation nette de la synthèse de PC, que ce soit en conditions optimales ou en situation de carence en Pi. Chez *A. thaliana*, la production du DGTS n'a pas semblé affecter la croissance ou le métabolisme, quelles que soient les conditions. Chez *N. benthamiana*, la surproduction du DGTS a engendré une prolifération de membranes du réticulum endoplasmique, sans autre impact apparent. Si la PC et les BL semblent se substituer parfaitement l'un à l'autre chez *P. tricornutum*, cela ne s'applique probablement pas aux plantes supérieures. Ces expériences *in vivo* consolident ainsi les hypothèses précédemment émises par (Bolik et al., 2023). Cette étude a suggéré que la PC et le DGTS n'étaient pas compatibles dans les membranes des organismes terrestres, contrairement aux membranes des organismes aquatiques. Les expériences menées chez *A. thaliana* semblent également aller dans ce sens, bien que les proportions de DGTS produites chez les lignées transformées aient été relativement faibles. L'analyse des feuilles infiltrées de *N. benthamiana* a quant à elle montré que la surproduction de DGTS engendrait un stockage de ce dernier dans des structures supplémentaires qui semblent se démarquer du reste des membranes extraplastidiales. Cela illustre probablement une réponse adaptative de la cellule face à la production accrue de ce lipide exogène.

Les expériences réalisées ont également apporté des informations intéressantes quant aux rôles des BL et de la PC dans l'adaptation des organismes à la carence de Pi. Chez *P. tricornutum*, le DGTA s'est révélé essentiel au maintien de la croissance et à la dégradation des phospholipides durant les phases précoces de la carence en Pi. Chez les lignées transformées d'*A. thaliana*, la production de DGTS n'a pas conféré d'avantages particulier aux plantes soumises à la carence. Ces résultats témoignent une fois de plus des différences qui existent entre les stratégies d'adaptation de ces deux organismes.

Les résultats obtenus chez *P. tricornutum* ont montré que la synthèse du DGTA et de la PC étaient intimement liées. L'absence du DGTA a généré une augmentation globale du niveau de PC. Les résultats obtenus chez les mutants de *N. oceanica* impactés dans la synthèse de la PC ont présenté une synthèse augmentée de DGTS, consolidant une fois de plus l'hypothèse d'un lien entre la synthèse de ces deux lipides. Selon la littérature, il existerait une corrélation négative entre les niveaux de BL et de PC retrouvés chez les espèces (Araki et al., 1991; Eichenberger et al., 1993; Lu et al., 2023; Sato, 1992; Sato & Furuya, 1985). Bien que les travaux de (Künzler et al., 1997) aient conclu qu'aucune corrélation quantitative n'existait entre les quantités de ces deux lipides, les données expérimentales semblent indiquer le contraire. Chez les plantes, les expériences réalisées n'ont pas permis d'identifier un lien entre la synthèse de ces deux lipides. Comme évoqué précédemment, il serait intéressant d'étudier la production de DGTS chez des plantes impactés dans leur niveau de PC pour approfondir cette hypothèse.

Que ce soit chez *P. tricornutum* ou chez les plantes supérieures, les BL ne semblent pas avoir d'impact sur le chloroplaste. Chez *P. tricornutum*, l'absence du DGTA n'a généré qu'une modification mineure des lipides plastidiaux. Chez les plantules analysées d'*A. thaliana*, les lipides plastidiaux ont également été très peu impactés par la production du DGTS. L'analyse lipidique des chloroplastes isolés de *N. benthamiana* ont montré que le DGTS n'était pas exporté dans le chloroplaste. L'ensemble de ces résultats indiquent que les BL sont bien des lipides extraplastidiaux, synthétisés et localisés hors du chloroplaste.

Les expériences réalisées au cours de cette étude ont permis de mieux comprendre la voie de synthèse du DGTA chez *P. tricornutum*. Cette voie de synthèse semble directement dépendre de celle du DGTS en raison de l'implication du gène *BTA1* dans la production de ces deux BL. Il serait également intéressant d'étudier la synthèse du DGCC, la troisième classe de BL identifiée chez les organismes. Aucune hypothèse n'a encore été émise concernant sa voie de biosynthèse. La structure du DGCC diffère de celles du DGTS et du DGTA ; le groupement carboxyle de la tête polaire est porté par un carbone acétal (lié à deux atomes d'oxygène), contrairement aux deux autres BL. Chez les organismes, le DGCC est bien moins répandu que le DGTS ou le DGTA ; il est limité aux organismes marins et sa présence est généralement associée à celle du DGTS et/ou du DGTA. D'après (Bolik et al., 2023), le DGCC et le DGTA seraient apparus ultérieurement au DGTS au cours de l'évolution chez les organismes marins. L'ensemble de ces observations suggère un lien entre la production des trois BL. Bien que la structure du DGCC diffère de celle des deux autres BL, il est possible que leurs voies de synthèse soient proches. Le DGTS serait le premier BL à être apparu au cours de l'évolution (Bolik et al., 2023), il est donc possible qu'il serve également de précurseur à la synthèse du DGCC. Au vu du peu d'informations

disponibles sur le DGCC, il semble toutefois difficile de tenter d'élucider sa voie de synthèse. Les tentatives d'identification du gène de synthèse du DGTA par l'analyse transcriptionnelle de *P. tricornutum* s'est révélée infructueuse en raison du nombre important de gènes dont l'expression était corrélée à celle de *BTA1*. Parmi les espèces productrices de DGCC, seules les microalgues *Tisochrysis lutea* et *Emiliana huxleyi* disposent d'un transcriptome accessible. Ces deux espèces produisent simultanément plusieurs types de BL et la quantité de DGCC y est très faible, rendant ainsi incertaine une éventuelle analyse transcriptionnelle. Une identification plus large des espèces productrices de DGCC serait donc nécessaire pour approfondir cet aspect. La faible disponibilité des génomes d'espèces productrices de DGCC s'explique également par la forte présence de ce BL chez les dinoflagellés, des organismes dont le génome complexe et la structure chromosomique particulière rendent le séquençage relativement difficile.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Organismes d'étude et conditions de culture

1.1. La plante modèle *Arabidopsis thaliana*

1.1.1. Ecotype

Arabidopsis thaliana est une angiosperme de la famille des Brassicacées. Les plantes sauvages et les lignées transformées obtenues dans cette étude sont issues de l'écotype Columbia-0 (Col0).

1.1.2. Stérilisation et vernalisation des graines

Afin d'éviter les contaminations parasitaires dans les chambres de culture, les graines sont placées à une température de -80°C pendant au moins 2 heures puis stérilisées avec une solution de stérilisation contenant 0,4 % d'eau de Javel (v/v) et 0,01 % de Triton (v/v) de Triton x100. Les graines à semer sont immergées dans 1 mL de solution de stérilisation et placées pendant 10 minutes sur une roue rotative. Après la sédimentation des graines, le surnageant est retiré et quatre lavages consécutifs sont effectués avec 1 mL d'eau stérile. Les graines stérilisées sont placées 2 à 3 jours à 4°C avant d'être semées sur boîte contenant de l'agar afin de les récolter (section 1.1.3) ou de générer des cals (section 1.1.4).

1.1.3. Culture *in vitro* et récolte des plantules

Les graines stérilisées d'*A. thaliana* destinées à être récoltées et analysées sont semées et cultivées sur un milieu agar stérile Murashige & Skoog (MS) dépourvu de phosphate (KH₂PO₄) (MS without KH₂PO₄, Duchefa Biochemie) et supplémenté avec 1% (v/v) de sucrose, 12% (p/v) d'agar (A7921, Sigma-Aldrich) et 1 mM de phosphate (Pi) pour la condition +Pi et 0,005 mM de Pi pour la condition -Pi. Le pH est ajusté à 5.7 avec du KOH. Les graines sont cultivées 21 jours dans des conditions de jour long (photopériode de 16h/18h lumière-obscurité) à une température de 20-22°C et une densité de flux de photons de 30-60 μmol/m²/s. À 21 jours, la partie foliaire située au-dessus de l'hypocotyle des plantules d'*Arabidopsis* est récoltée, immédiatement congelée dans de l'azote liquide et stockée à -80°C. Ces échantillons sont utilisés ultérieurement pour l'analyse des lipides (cf. section 4).

1.1.4. Génération de cals à partir de plantules

Les graines stérilisées d'*A. thaliana* sont semées et cultivées sur un milieu agar stérile MS (MSP09, Caisson Laboratories, Inc, USA) supplémenté avec 3 % (p/v) de sucrose, 1.2 mg.L⁻¹ d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et 0,8 % (p/v) d'agar. Le pH est ajusté à 5.7 avec du KOH. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique est utilisé pour induire la dédifférenciation des cellules végétales et

maintenir les cellules indifférenciées. Après deux semaines de croissance, les cotylédons des plantules sont coupés en quatre morceaux à l'aide d'un scalpel et placés sur le même milieu MS solide contenant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. Après environ 3 semaines de croissance sous lumière continue à 22°C, les cellules dédifférenciées forment des cals qui peuvent être transférés sur un nouveau milieu MS solide. Les cals sont ensuite repiqués sur de nouvelles boîtes une fois par mois.

1.1.5. Culture et récolte des cals en milieu liquide

Après 4 semaines de pousse sur une nouvelle boîte MS solide, des morceaux de cals sont placés en conditions stériles et à l'aide d'un scalpel dans un flacon sphérique contenant 200 mL de milieu liquide MS (MS sans KH_2PO_4 , Duchefa Biochemie) supplémenté avec 0,5 mM de phosphate, 1,5 % (p/v) de saccharose et 1,2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. Le pH est ajusté à 5.7 avec du NaOH. Les cals sont conservés sous lumière continue (100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) à 22°C, agités avec un agitateur rotatif à 125 rpm et transférés dans un nouveau milieu tous les 7 jours. Pour les analyses lipidiques en conditions de carence en phosphate (Pi), les cals sont lavés trois fois avec 50 mL de milieu MS -Pi (MS sans KH_2PO_4 , Duchefa Biochemie) contenant 0,5 mM de Pi pour la condition +Pi (ou sans ajout de Pi pour la condition -Pi). Les cals sont ensuite cultivés pendant 4 ou 8 jours dans le milieu correspondant. A la récolte, les cals sont filtrés pour retirer le milieu de culture. 500 à 800 mg de cals sont prélevés et directement congelés à l'azote liquide puis stockés à -80°C.

1.2. La plante modèle *Nicotiana benthamiana*

1.2.1. Description et conditions de culture

Nicotiana benthamiana est une angiosperme de la famille des Solanacées. Toutes les plantes utilisées dans cette étude sont de type sauvage. Les plantes sont cultivées dans des conditions de jours longs (photopériode 16h-8h lumière-obscurité) à 18-20°C avec une humidité de 60-70 % et une densité de flux de photons de 100-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Avant d'être agroinfiltrées, les plantes sont cultivées pendant 4 à 5 semaines sur un terreau (35 L) supplémenté de vermiculite (7 L) et de fongicide biologique (Prestop, Lallemand, 10 g) et arrosées 3 fois par semaine.

1.2.2. Récolte des feuilles infiltrées

Les analyses lipidiques effectuées sur les feuilles de *N. benthamiana* sont réalisées 4 ou 8 jours après l'infiltration. Les feuilles sont sectionnées au niveau du pétiole à l'aide de ciseaux, enveloppées dans du papier aluminium et directement congelées à l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C.

1.3. La bactérie compétente *Escherichia coli* NEB5α

Escherichia coli (*E. coli*) est une entérobactérie à Gram-négatif. L'ensemble des transformations réalisées sur *E. coli* ont été réalisées sur la souche compétente NEB 5α (New England BioLabs), dérivée de la souche DH5α (60602 Lucigen). Les bactéries NEB 5α ont une efficacité de transformation accrue et possèdent le génotype *fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*. Elles sont cultivées dans un milieu solide ou liquide contenant une concentration d'antibiotiques détaillée dans le **Tableau 2**. Le milieu de culture solide est composé de 2 % d'agar dissous dans un milieu LB (Lysogeny Broth) versé dans des boîtes de pétri. Les bactéries étalées sur ce milieu solide sont cultivées à 37°C pendant au moins 8h. Les cultures liquides sont réalisées dans un LB liquide à 37°C sous agitation constante à 180 rpm pendant au moins 8h.

1.4. L'agrobactérie *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens (*A. tumefaciens*) est une bactérie phytopathogène à Gram-négatif. La souche C58C1 possédant le génotype *strR RifR pRiA4b* (type agropine) a été utilisée pour les expressions transitoires de *N. benthamiana* et les immersions florales d'*A. thaliana*. *A. tumefaciens* est cultivée sur le même milieu qu'*E. coli*, à 28°C pendant 24h pour les cultures liquides et pendant 72h pour la croissance sur milieu solide. Les cultures liquides d'*A. tumefaciens* destinées aux transformations de *N. benthamiana* ou *A. thaliana* contiennent également de l'acétosyringone à 20 µM. L'acétosyringone est un composé phénolique produit par les plantes blessées ; il augmenterait la production de facteurs de virulence chez *A. tumefaciens* (Engström et al., 1987) et améliorerait l'efficacité de transformation chez les plantes (Sheikholeslam & Weeks, 1987).

Tableau 2 : Antibiotiques utilisés pour la sélection bactérienne (*E.coli* et *A. tumefaciens*). Les concentrations finales utilisées dans le milieu LB sont indiquées. Les antibiotiques ont été préparés à une concentration de 1000x et dilués directement dans le milieu LB.

Antibiotique	Concentration dans le milieu LB
Spectinomycine	50 µg/mL
Streptomycine	50 µg/mL
Kanamycine	50 µg/mL
Carbénicilline	100 µg/mL
Rifampicine	50 µg/mL
Gentamycine	30 µg/mL
Chloramphénicol	30 µg/mL

1.5. La microalgue modèle *Phaeodactylum tricornutum*

1.5.1. Informations sur *P. tricornutum* et sur la souche utilisée

P. tricornutum est une microalgue appartenant à la famille des diatomées pennées. C'est un modèle d'étude largement utilisé en laboratoire pour comprendre la biologie des algues marines. Son génome a été entièrement séquencé en 2008 (Bowler et al., 2008) et a bénéficié d'une ré-annotation dans sa troisième version (Phatr3). Le lipidome de *P. tricornutum* sous différentes conditions est également disponible (Abida et al., 2015). Facilement cultivable en laboratoire, *P. tricornutum* dispose de plusieurs outils génétiques performants pour l'édition de son génome, tels que la transformation par biolistique (Falciatore et al., 1999) ou la conjugaison bactérienne (Karas et al., 2015). L'ensemble des expériences de cette étude 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).

1.5.2. Composition du milieu de culture

Le milieu ESAW (Enriched Seawater, Artificial Water) est utilisé pour la culture des algues marines, en particulier les diatomées. Sa composition est la suivante : NaCl (326.7 mM), Na₂SO₄ (25 mM), KCl (8.03 mM), KBr (0.725), H₃BO₃ (0.372 mM), NaF (0.0657 mM), MgCl₂ (47.18 mM), CaCl₂ (9.134 mM), SrCl₂ (0.082 mM), Fe-EDTA (8.17 μM), Na₂EDTA (8.3 μM), ZnSO₄ (0.254 μM), CoCl₂ (0.0672 μM), MnCl₂ (2.73 μM), Na₂MoO₄ (6.12 nM), Na₂SeO₃ (1 nM), NiCl₂ (6.27 nM), CuSO₄ (0.039 nM), vitamine B8 (4.09 nM), vitamine B12 (0.738 nM), vitamine B1 (0.593 μM), NaNO₃ (0.549 mM), et NaH₂PO₄ (0.022 mM). Ce milieu est préparé dans des conditions stériles en utilisant des solutions stocks stérilisées par autoclave ou par filtration à travers un filtre à membranes d'une porosité de 0,22 μm. Ce milieu enrichi est utilisé dans le cadre des conditions optimales de culture, également désignées sous l'appellation « +Pi » en raison de la présence de Pi dans le milieu (ESAW +Pi). Le milieu dépourvu de Pi (ESAW -Pi) possède la même composition que le milieu +Pi à l'exception du composant NaH₂PO₄ qui est retiré.

La culture de *P. tricornutum* sur milieu solide est réalisée sur des boîtes de pétri ESAW +Pi complémentées d'agar (1% p/v) préalablement autoclavée. La Carbénicilline (0,237 μM) est également ajoutée au milieu solide ; *P. tricornutum* y est naturellement résistante et son utilisation permet d'éviter les contaminations bactériennes. L'antibiotique Zéocine (0,07 μM) est également ajouté pour sélectionner les souches transformées avec des épisomes CRISPR-Cas9. Les antibiotiques sont ajoutés avant la polymérisation de l'agar, en conditions stériles.

1.5.3. Conditions de culture

Les cellules de *P. tricornutum* cultivées sur un milieu solide sont placées dans un incubateur (MLR-352-PE Climate Chamber) réglé à 20°C sous une exposition continue de lumière à une intensité de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les colonies sont transférées sur un milieu frais toutes les 4 à 6 semaines.

Les cellules sont transférées d'un milieu solide à un milieu liquide de façon séquentielle. Des erlenmeyers en verre de 25 mL sont initialement utilisés pour démarrer la culture liquide, les cellules sont ensuite cultivées et amplifiées dans des erlenmeyers de volume croissant, soit 50 mL, 100 mL et 250 mL. Le volume total de culture ne dépasse pas 1/5^{ème} de la capacité de l'erlenmeyer ; soit respectivement 5 mL, 10 mL, 20 mL et 50 mL pour des erlenmeyers de 25 mL, 50 mL, 100 mL et 250 mL. Ces cultures sont placées dans un incubateur (INFORS Multitron Pro) réglé à une température constante de 20°C, avec une agitation continue à 100 rpm et un cycle lumineux de 12 heures jour / 12 heures nuit. L'intensité lumineuse est maintenue à 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La concentration cellulaire initiale est de $0,5.10^6$ cellules.mL⁻¹. Les cultures sont repiquées 1 à 2 fois par semaine et sont maintenues par des dilutions à une concentration de 2.10^6 à 5.10^6 cellules.mL⁻¹.

Pour les analyses lipidiques réalisées dans la condition +Pi, les cellules de *P. tricornutum* sont cultivées en triplicat dans 50 mL de milieu ESAW +Pi dans des erlenmeyers de 250 mL pendant 4 ou 8 jours à une concentration initiale de $0,5.10^6$ cellules.mL⁻¹. Pour les suivis de croissance réalisés dans la condition +Pi, les cellules sont cultivées dans 30 mL de milieu ESAW +Pi à une concentration initiale de $0,5.10^6$ cellules.mL⁻¹.

Pour les suivis de croissance et les analyses lipidiques réalisées dans la condition -Pi, les cellules de *P. tricornutum* sont cultivées en triplicat dans 50 mL de milieu ESAW +Pi dans des erlenmeyers de 250 mL pendant 4 jours à une concentration initiale de $0,5.10^6$ cellules.mL⁻¹. Les cultures sont ensuite transférées dans des tubes stériles en polypropylène de 50 mL et centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est retiré, les cellules sont ensuite resuspendues dans 20 mL de milieu ESAW -Pi et centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes. Après retrait du surnageant, cette étape de centrifugation et de resuspension est répétée 3 fois. Pour les analyses lipidiques, les cellules de chaque triplicat sont resuspendues dans 50 mL de milieu ESAW -Pi et transférées dans des erlenmeyers de 250 mL à une concentration de 1.10^6 cellules.mL⁻¹. Pour les suivis de croissance, les cellules sont transférées dans 30 mL de milieu ESAW -Pi à une concentration initiale de $0,5.10^6$ cellules.mL⁻¹.

1.5.4. Récolte des cellules

Pour les analyses lipidiques réalisées en condition +Pi, la récolte des cellules est effectuée après 4 jours d'une culture initialement démarrée à $0,5 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹ dans un volume de 50mL. Pour les analyses lipidiques réalisées en condition -Pi, la récolte des cellules est réalisée après 4 et 8 jours d'une culture initialement démarrée à $1 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹ dans un volume de 50mL. Pour chaque culture, un volume contenant $150 \cdot 10^6$ de cellules est récolté et centrifugé à 3500 g pendant 10 minutes. Le surnageant est partiellement retiré pour permettre la resuspension des cellules puis transféré dans des microtubes de centrifugation Low Binding de 1,5 mL. Ces derniers sont centrifugés à 100 g pendant 4 minutes. Le surnageant est éliminé et les culots cellulaires sont congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

2. Méthodes de biologie moléculaire

2.1. Réaction de polymérisation en chaîne

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) effectuées pour les clonages moléculaires (PCR d'amplification à partir d'ADN complémentaire ou de plasmides) ont été réalisées avec l'enzyme Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs N°M0530S) avec les constituants listés dans le **tableau 3**. Le programme des PCR a été réalisé suivant les instructions du fabricant, à savoir une 1^{ère} étape de dénaturation de 30 secondes à 98°C, 35 cycles de 10 secondes à 98°C, 30 secondes à la température d'hybridation des amorces, 30 secondes/kb à 72°C puis une extension finale de 10 minutes à 72°C. Les PCR de criblage effectuées sur les colonies d'*E. coli* transformées ont été réalisées avec l'enzyme PHIRE Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific), selon les constituants listés dans le **tableau 4**. Le programme des PCR a été réalisé suivant les instructions du fabricant, à savoir une 1^{ère} étape de dénaturation de 5 minutes à 98°C, 40 cycles de 5 secondes à 98°C, 5 secondes à la température d'hybridation des amorces, 20 secondes/kb à 72°C puis une extension finale de 1 minute à 72°C.

	Concentration stock	Concentration finale	Volume (µL)
5X Phusion HF Buffer	5x	1x	10
dNTPs	10mM	200 µM chacun	1
Amorce sens	10 µM	0,5 µM	2,5
Amorce anti-sens	10 µM	0,5 µM	2,5
matrice	ADNc ou plasmide	De 100 à 250 ng	0,25
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/µL	0,02 U/µL	0,5
H ₂ O	-	-	QSP 50 µL

Tableau 3 : Constituants des PCR d'amplification réalisées sur les ADN complémentaires ou les plasmides.

	<i>Concentration stock</i>	<i>Concentration finale</i>	<i>Volume (μL)</i>
<i>PHIRE Plant Direct PCR Master Mix</i>	2x	1x	10
<i>Amorce sens</i>	10 μM	0,5 μM	2
<i>Amorce anti-sens</i>	10 μM	0,5 μM	2
<i>Matrice</i>	-	-	colonie
<i>H₂O</i>	-	-	6
<i>Volume final</i>	-	-	20

Tableau 4 : Constituants des PCR de criblage réalisées sur les colonies (bactéries ou *P. tricornutum*).

2.2. La méthode d'assemblage Gibson

La méthode d'assemblage Gibson se base sur l'homologie de séquence et permet d'assembler différents fragments au sein d'un vecteur. Le vecteur receveur est préalablement digéré et les fragments à insérer amplifiés par PCR. Environ 15 fmol de chaque fragment à assembler sont ajoutés à un mélange de réaction Gibson composé de 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,2 mM de dATP, 0,2 mM de dCTP, 0,2 mM de dGTP, 0,2 mM de dTTP, 10 mM de dithiothréitol, 0,05 g/mL de polyéthylène glycol (PEG)-8000, 1 mM de NAD, 2,5 mU/μL d'exonucléase T5 (New England Biolabs N°M0363S), 25 mU/μL de Phusion High Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs N°M0530S) et 4 U/μL de ligase TAQ DNA (New England Biolabs N°M0208S) dans un volume final de 20 μL. Le mélange de réaction incubé à 50°C pendant 1h est prêt à être utilisé pour la transformation de bactéries *E. coli*.

2.3. Transformation des bactéries *E. coli* NEB5α

Pour l'ensemble des transformations réalisées, 25 μL de bactéries NEB5α sont utilisées. Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, les bactéries NEB5α sont ajoutées à environ 100 ng d'ADN. Les tubes sont incubés 30 minutes sur de la glace puis placés dans un bloc chauffant 40 secondes à 42°C. Les tubes sont ensuite transférés sur la glace pendant 2 minutes. 500 μL de milieu LB sont ajoutés aux tubes. Ces derniers sont incubés à 37°C pendant 1 heure sous une agitation de 180 rpm. Les bactéries sont ensuite étalées sur une boîte agar LB contenant l'antibiotique adéquat et incubées 12 heures à 37°C.

2.4. Transformation des agrobactéries *A. tumefaciens*

100 ng d'ADN plasmidique sont utilisés pour transformer les cellules compétentes d'*A. tumefaciens*. Les cellules sont incubées avec l'ADN à 37°C pendant 5 minutes. 900 μL de milieu LB sont ensuite ajoutés ; les cellules sont incubées 2 heures à 28°C avant d'être étalées sur des boîtes agar LB contenant les antibiotiques adéquats. Les agrobactéries sont cultivées à 28°C pendant 2 à 3 jours jusqu'à l'apparition de colonies sur les boîtes.

2.5. Extraction et purification d'ADN depuis *E.coli*

Pour l'extraction de plasmides à partir d'*E. coli*, le kit NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL) est utilisé pour des cultures bactériennes ensemencées dans 3 mL. La purification d'ADN à partir de PCR, de digestion enzymatiques ou de gels d'électrophorèse est réalisée en utilisant le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (740609.250, MACHEREY-NAGEL). L'ensemble des expériences sont réalisées en suivant les instructions du fabricant.

2.6. Constructions utilisées pour les transformations stables d'*A. thaliana*

Les lignées transformées d'*A. thaliana* analysées dans cette étude ont été générées avec la construction génétique pMGD3-Sec63TM-MgBTA1-HAx3. pMGD3 est un promoteur inductible à la carence en Pi (Shimajima et al., 2015), Sec63TM correspond au segment transmembranaire d'une protéine du réticulum endoplasmique et MgBTA1 correspond à la séquence codante du gène *BTA1* issu de *M. gaditana* (Naga_100016g36). La séquence MgBTA1 a été obtenue à partir d'ADN complémentaire (ADNc) de *M. gaditana* en utilisant l'amorce sens `tttgagaggacacgctgacaagctgacatgtgcaatgttctcgcgat` et l'amorce anti-sens `agaagcgtagtcttgaacgtcgtatgggtactgggcttttgattgccgg`.

Le vecteur d'expression pFP108-HAx3 (To et al., 2006) (**Figure 27**) a été utilisé pour générer la construction pMGD3-Sec63TM-MgBTA1-HAx3. Ce vecteur est employé pour la transformation génétiques des plantes. Il contient le promoteur 35S issu du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35s) et un terminateur de la synthèse de nopaline (tnos). Ici, le promoteur 35S a été retiré et remplacé par le promoteur pMGD3. Le promoteur, le terminateur et un site multiple de clonage sont présents entre les bordures gauche et droite de l'ADN de transfert (ADN-T). L'ensemble des séquences (pMGD3, Sec63TM, MgBTA1) ont été insérées dans le vecteur pFP108-HAx3 par la technique d'assemblage Gibson.

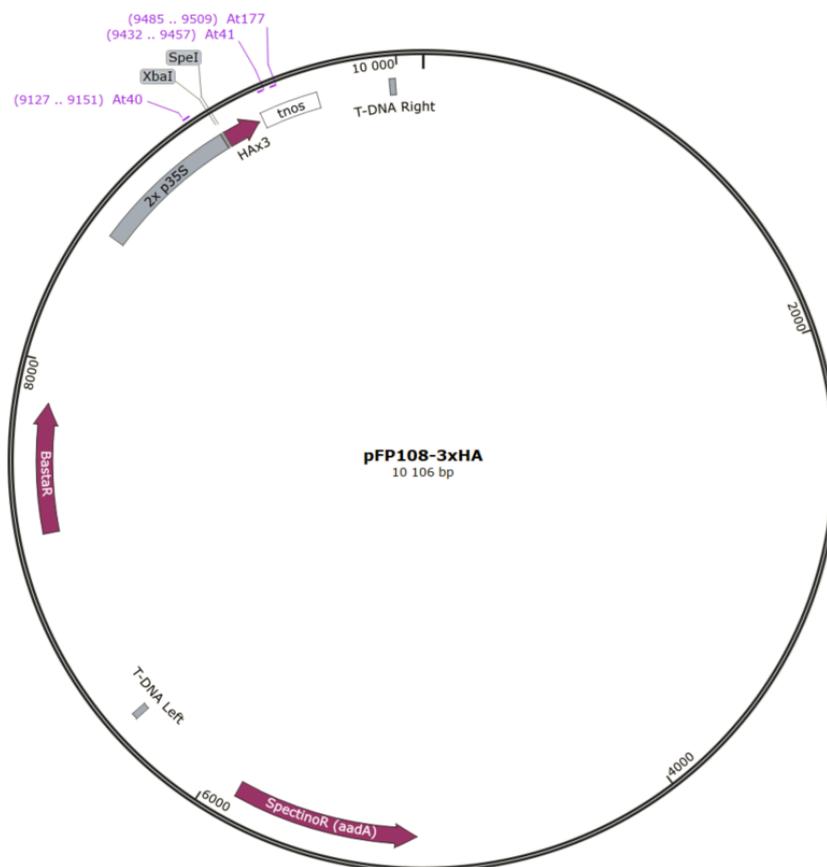


Figure 27 : Carte du plasmide pFP108-HAx3.

2.7. Constructions utilisées pour les transformations transitoires de *N. benthamiana*

Les constructions utilisées pour la transformation transitoire de *N. benthamiana* ont également été générées à partir du vecteur pFP108-HAx3 (**Figure 27**) ou pFP108 (**Figure 28**).

Pour les constructions KIBTA1, MpBTA1 et CrBTA1, utilisées pour les analyses TLC, les gènes *BTA1* ont été amplifiés à partir des ADNc de *Kluyveromyces lactis* (KLLA0_F22198g), *Marchantia polymorpha* (MARPO_0023s0088) et *Chlamydomonas reinhardtii* (CHLRE_07g324200v5), respectivement. Les amorces sens/anti-sens utilisées étaient

atctcattggagaggacacgctgacaagctgacATGTTCTCGGCTACATGAAGCACG/aagaagcgtagctctgaacgtcgtatgggta
 ATTGTTCTCGAGGTCGAGTGAAG pour KIBTA1,

tcattggagaggacacgctgacaagctgacATGGTGATGGAAAGCGTGAAGG/aagaagcgtagctctgaacgtcgtatgggtaCT
 TGGCATCGGTAGGAGTGC pour MpBTA1, et

ttcattggagaggacacgctgacaagctgacATGGGATCTGGAAGAGATGGAAGG/ccaaagaagcgtagctctgaacgtcgtat
 gggttaATTGTCCTTCTAGCGCCCTTAC pour CrBTA1. Ces gènes amplifiés ont ensuite été insérés dans le

vecteur pFP108-HAx3 par la méthode Gibson. Le même protocole a été effectué avec la séquence MgBTA1 (voir ci-dessus).

Pour la construction PtBTA1-GFP, la séquence codante du gène *PtBTA1* (Phatr3_J42872) a été amplifiée à partir de l'ADNc de *Phaeodactylum tricornutum* avec l'amorce sens gagaggacacgctgacaagctgactctagaATGATTGCCAGTCTCAAATCAC et l'amorce anti-sens agtgaaaagttcttctctttactggatccGTCCGTCTTTTTTCTTCGCC. Pour la construction nf-PtBTA1-GFP, le gène *PtBTA1* (Phatr3_J42872) a été amplifié à partir de l'ADN génomique de *Phaeodactylum tricornutum* avec l'amorce sens catttggagaggacgctgacaagctgacatgccggagatgcttccc et l'amorce anti-sens aagcgtagtcttgaacgtcgtatggtagtccgtcttttttcttccc.

Pour les constructions MgBTA1-GFP et nf-BTA1Pt-GFP, les gènes *BTA1* amplifiés ont été clonés dans le vecteur pFP108-HAx3 par la méthode Gibson, en phase avec la séquence 3xHA et la séquence GFP en C-terminal, ainsi que le fragment transmembranaire Sec63 en N-terminal. Pour la construction PtBTA1-GFP, le gène *BTA1* amplifié a été cloné dans le vecteur pFP108 en phase avec la séquence GFP en C-terminal. L'expression des gènes à partir de ce vecteur est sous le contrôle de deux promoteurs 35S et d'un terminateur tnos (**Figure 28**).

Un schéma récapitulatif de l'ensemble des constructions utilisées se trouve dans la figure S1 de l'article de recherche présenté dans le chapitre 1 de ce manuscrit.

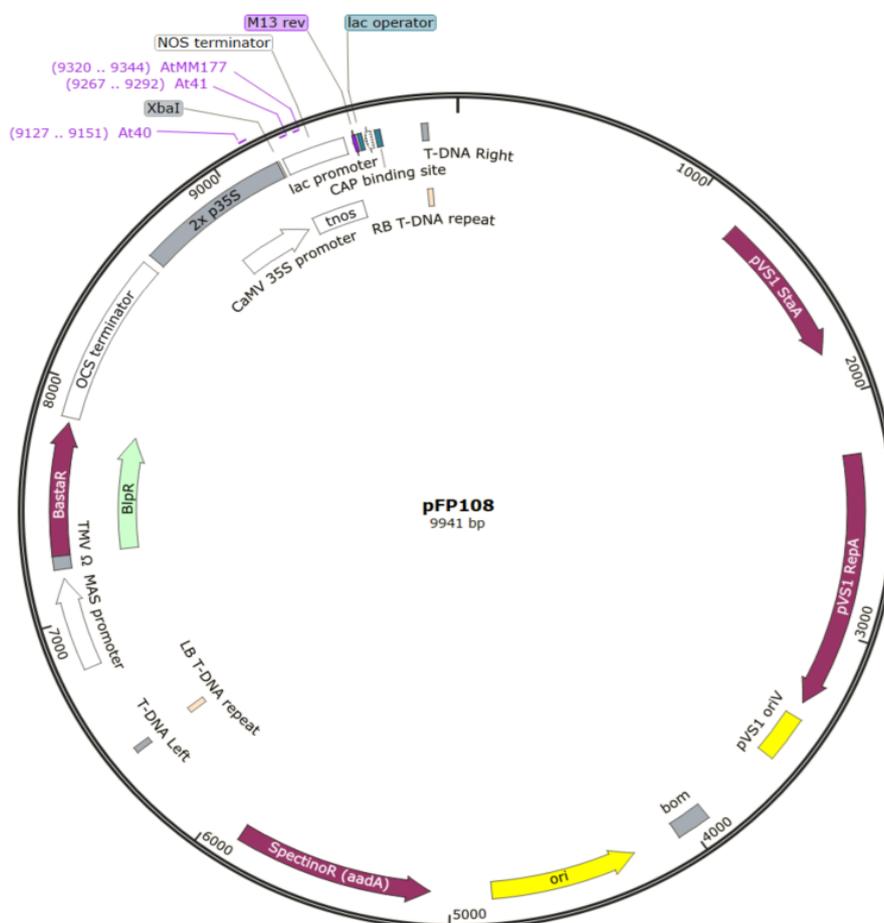


Figure 28 : Carte du plasmide pFP108.

2.8. Constructions utilisées pour les transformations de *Phaeodactylum tricornutum*

2.8.1. Choix des ARN guides CRISPR-Cas9

Le choix des ARN guides (sgRNA) a été réalisé à l'aide des sites Web PhytoCrispex (www.phytoCrispex.biologie.ens.fr/CRISP-Ex/) et crispor.tefor (<http://crispor.tefor.net/>) en utilisant le génome de *P. tricornutum* en tant que référence. Le motif NGG (nucléotide aléatoire suivi de 2 guanines) a été choisi en tant que séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif) ; une séquence spécifique de 3 nucléotides reconnue par l'enzyme Cas9. Ici, la Cas9 utilisée pour induire les mutations est issue de la bactérie *Streptococcus pyogenes* ; elle reconnaît spécifiquement les motifs NGG sur l'ADN et peut ainsi induire des coupures double brin. Les sgRNA ont donc été choisis en fonction de la position des motifs NGG localisés sur le gène cible (ici, le gène *PtBTA1* : Phatr3_J42872). Ils sont constitués d'une séquence de 20 nucléotides adjacents à un motif NGG. Les sgRNA choisis dans cette étude sont localisés avant le premier domaine (sgRNA26), à la fin du domaine DUF3419 (sgRNA27) et au tout début du domaine Méthyltransférase (sgRNA4) du gène Phatr3_J42872 (**Figure 29**).

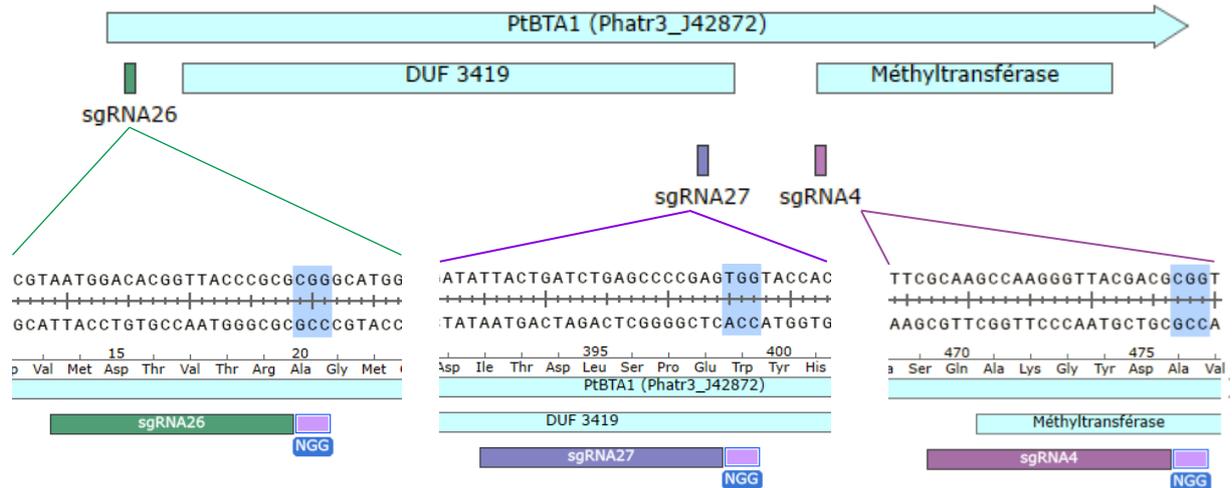


Figure 29 : Localisation et séquence des sgRNA sur le gène Phatr3_J42872. Le motif NGG situé en 3' des sgRNA est également représenté.

2.8.2. Construction des vecteurs CRISPR-Cas9

Afin de générer des mutations sur les séquences des sgRNA désignées, des vecteurs de transformations CRISPR-Cas9 ont été générés. L'épisome PtPuc3_diaCas9_sgRNA fourni par addgene (Plasmide #109219) a été utilisé (**Figure 30**). Cet épisome conçu pour la transformation de *P. tricornutum* contient tous les éléments nécessaires à la technologie CRISPR-Cas9, notamment l'enzyme Cas9 et le "scaffold" du sgRNA. Afin d'insérer les sgRNA dans le vecteur, des inserts double brin ont été générés à l'aide d'amorces spécifiques pour chaque sgRNA (**Tableau 5**). Des courtes séquences de nucléotides TCGA et AAAC ont été rajoutées respectivement aux amorces sens et anti-sens afin de créer des extrémités cohésives pour la ligation ultérieure avec l'épisome PtPuc3_diaCas9_sgRNA (**Figure 31**). Les amorces conçues ont été commandées sur le site Web ThermoFisher (www.thermofisher.com/fr).

Nom	Position sur la CDS (2148 nt)	Séquence 5'→3'	Amorce sens 5'→3'	Amorce anti-sens 5'→3'
sgRNA26	nt 39..58	AATGGACACGGTTACCCGCG	TCGAATGGACACGGTTACCCGCG	AAACCGCGGGTAACCGTGTCCATT
sgRNA27	nt 1175..1194	TTACTGATCTGAGCCCCGAG	TCGATTACTGATCTGAGCCCCGAG	AAACCTCGGGCTCAGATCAGTAA
sgRNA4	nt 1407..1429	GCAAGCCAAGGGTTACGACG	TCGAGCAAGCCAAGGGTTACGACG	AAACCGTCGTAACCCCTTGCTTGC

Tableau 5 : Détails des sgRNA et des amorces commandées pour la construction des vecteurs CRISPR-Cas9. CDS : séquence codante du gène Phatr3_J42872. nt : nucléotide.

Les inserts sgRNA ont été préparés en hybridant la paire correspondante d'amorces (**Tableau 5**). 2,5 µL de chaque amorce à 100 µM ont été mélangés à 45 µL de tampon d'hybridation (1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,6) pour une concentration finale de 5 µM, puis chauffés à 95°C pendant 4 minutes et refroidis à température ambiante pendant 45 minutes.

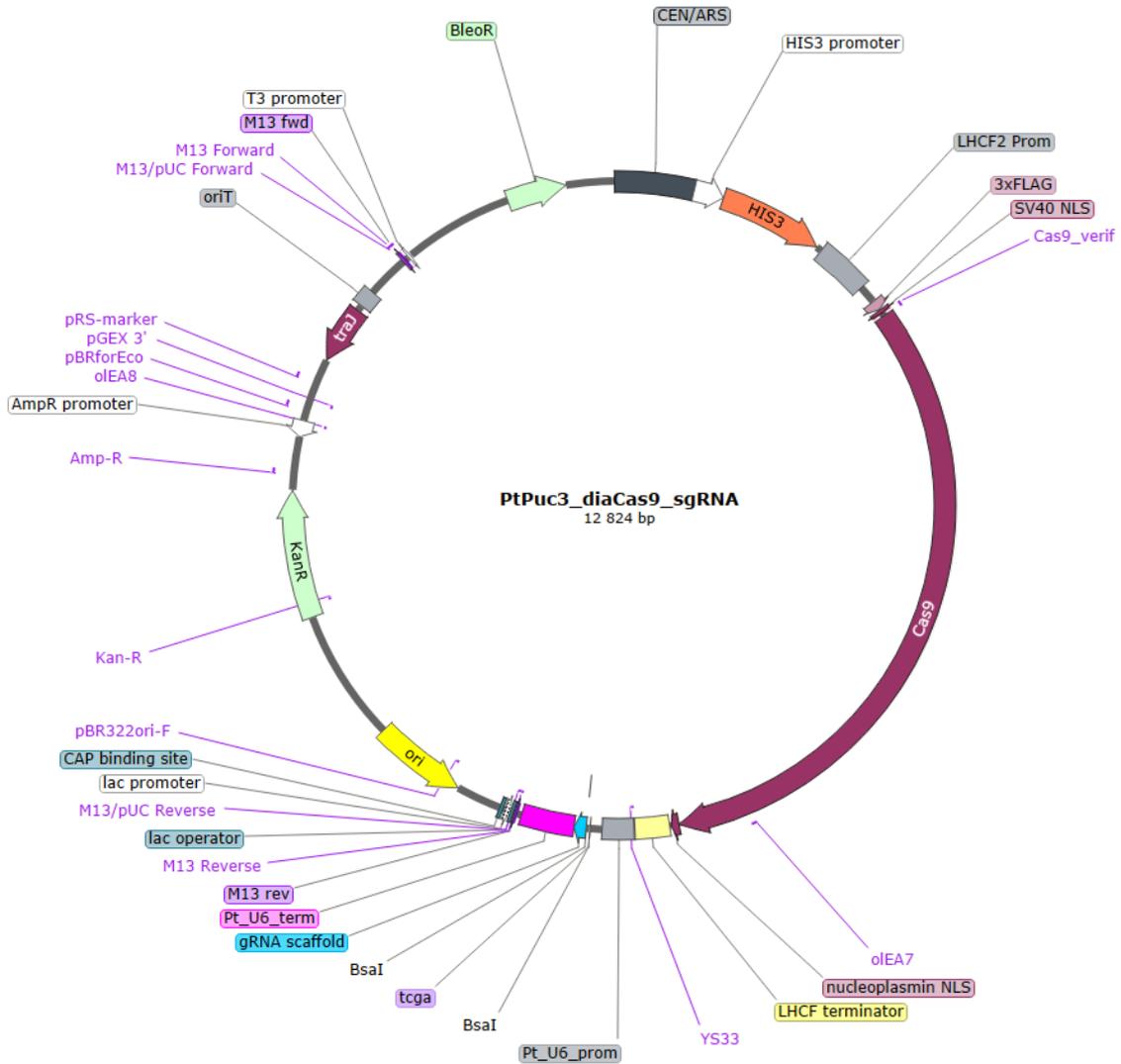


Figure 30 : carte du plasmide PtPuc3_diaCas9_sgRNA.

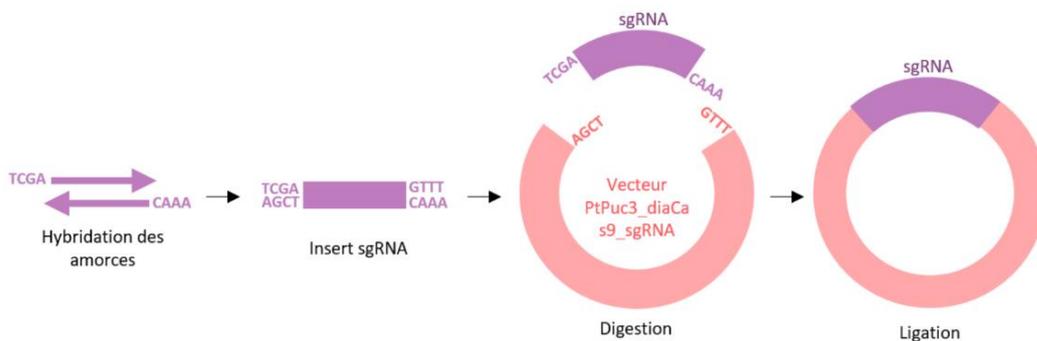


Figure 31 : Stratégie de construction du vecteur d'expression CRISPR-Cas9. L'insert sgRNA est généré par hybridation du couple d'amorces. Le vecteur et l'insert sont préalablement digérés indépendamment par l'enzyme de restriction BsaI avant d'être f par ligation.

Parallèlement à la création des inserts sgRNA, l'épisode PtPuc3_diaCas9_sgRNA a été digéré par restriction afin de générer un vecteur linéarisé aux extrémités cohésives correspondantes à celles de l'insert sgRNA (**Figure 31**). Pour la digestion, 3,5 µL d'épisode PtPuc3_diaCas9_sgRNA (équivalent à 2000 ng), 2 µL d'enzyme BsaI (5'-GGTCTC(N1)/(N5)-3') (New England BioLabs), 4 µL de « cutsmart Buffer » (New England BioLabs) et 10,5 µL d'eau ont été mélangés et incubés à 37°C pendant 1 heure et 30 minutes. Après digestion, 1 µL des inserts sgRNA préalablement préparés ont été mélangés à 100 ng de l'épisode PtPuc3_diaCas9_sgRNA linéarisé en utilisant la T4 DNA ligase (New England BioLabs) et en suivant les instructions du fabricant.

Le produit de ligation a ensuite été transformé dans la bactérie *E. coli* NEB5α (*cf.* section 2.3) afin de multiplier l'épisode portant le sgRNA. Les bactéries ont été criblées afin de vérifier la bonne insertion du sgRNA dans l'épisode PtPuc3_diaCas9_sgRNA. Le criblage a été réalisé par PCR sur les colonies obtenues après transformation (**Tableau 4**). Les amorces sens oEA7 (ggcgaactccagaaggga) et anti-sens oEA8 (cgcggaaccctattgttt) (**Figure 30**) ont été utilisées afin d'amplifier la région de l'épisode contenant le site d'insertion du sgRNA. Le produit PCR obtenu a été digéré par les enzymes de restriction BsaI et PvuI selon le protocole suivant : 1 µL de « cutsmart buffer » (New England BioLabs), 0,5 µL de chaque enzyme de restriction et 8 µL de produit PCR sont mélangés et incubés 1 heure à 37°C. Les produits de PCR digérés ont ensuite migré sur un gel d'électrophorèse. Le profil de digestion attendu des amplicons contenant le sgRNA est constitué de deux bandes tandis que celui des amplicons ne contenant pas le sgRNA est constitué de 3 bandes en raison de la présence du site de restriction BsaI. Ce premier criblage par profil de digestion a permis de sélectionner les colonies positives. Les digestions validées ont donc été purifiées et envoyées pour séquençage afin de vérifier l'insertion et la séquence correctes du sgRNA dans l'épisode.

3. Méthodes de transformations génétiques

3.1. Transformation stable d'*A. thaliana* par immersion florale

Les plantes d'*A. thaliana* sont cultivées pendant environ 6 semaines jusqu'à ce que les inflorescences contiennent un grand nombre de bourgeons floraux. Pour augmenter le nombre de tiges portant des inflorescences, la première tige qui émerge au-dessus de la rosette est coupée pour permettre la croissance des tiges secondaires. 24 heures avant l'immersion florale (floral dip), des pré-cultures de 2 mL sont démarrées à partir d'une seule colonie d'agrobactérie transformée et étalée sur une boîte agar LB contenant les antibiotiques appropriés. Les pré-cultures sont cultivées pendant 8 heures à 28°C sous une agitation de 180 rpm. Après 8 heures, les pré-cultures sont transférées dans 100 mL de milieu LB liquide contenant le même mélange d'antibiotiques supplémenté d'acétosyringone (50 µM). Elles

sont cultivées pendant 16 heures à 28°C sous une agitation de 180 rpm. Après 16 heures de croissance, la densité optique à 600 nm (DO_{600}) des cultures est mesurée. Un équivalent de DO à 140 est récolté dans des tubes Falcon de 50 mL. Les bactéries sont centrifugées à 5000 g pendant 20 minutes et les culots sont resuspendus dans 200 mL de tampon de floral dip (Murashige & Skoog avec vitamines [MSP09, Caisson Labs] 2,1 g/L, 5% (p/v) de saccharose, 0,05% (v/v) d'adjuvant Silwet-77, 200 μ M d'acétylsyringone). Toutes les inflorescences sont plongées dans la solution d'agrobactéries pendant 30 secondes et les plantes traitées sont isolées dans un environnement humide pour favoriser l'activité de la bactérie. Les plantes sont ensuite maintenues dans l'obscurité pendant 48 heures puis remises dans des conditions de croissance normales.

Les plantes traitées sont cultivées jusqu'à l'apparition des siliques, puis laissées à sécher pour récupérer les graines. Pour sélectionner les graines transformées, environ 500 μ L de graines sont semées sur du terreau et germées. Deux à trois semaines après le semis, les plantules sont pulvérisées avec une solution aqueuse contenant 0,1% (v/v) d'herbicide Basta contenant du glufosinate d'ammonium (Basta®, Profert). Les plantules transformées avec le transgène portent un gène conférant une résistance à l'herbicide, permettant ainsi leur sélection.

3.2. Transformation transitoire de *N. benthamiana* par agroinfiltration

Environ cinq colonies d'agrobactéries transformées avec la construction souhaitée sont utilisées pour ensemercer 10 mL de milieu LB contenant le mélange approprié d'antibiotiques, supplémenté d'acétylsyringone (20 μ M) et de l'antibiotique approprié pour la sélection des plasmides. En plus des souches transformées avec les constructions d'intérêt, la souche d'*A. tumefaciens* exprimant la protéine P19 est également utilisée. La protéine P19 est un suppresseur de silencing post-transcriptionnel améliorant l'expression transitoire des transgènes (Voinnet et al., 2003). La souche P19 est cultivée de la même manière que les autres souches transformées. Toutes les souches sont cultivées pendant 24 heures à 28°C sous une agitation de 180 rpm, puis centrifugées pendant 10 minutes à 4 000 rpm. Les culots sont resuspendus dans 5 mL de tampon d'agroinfiltration (MgCl₂ 1 mM, acétylsyringone 200 mM) et ensuite dilués pour obtenir des suspensions cellulaires de 5 mL ou 10 mL avec une DO_{600} de 1. Les différentes souches d'agrobactéries sont ensuite mélangées dans un rapport de 1:1. La souche P19 est utilisée pour l'ensemble des agroinfiltrations.

À l'aide d'une aiguille, une petite lacération superficielle est effectuée sur la face abaxiale des jeunes feuilles de *N. benthamiana* âgées de 3 à 4 semaines. Un volume approprié de suspension bactérienne est injecté dans la feuille à travers la lacération avec une seringue de 1 mL jusqu'à ce que toute la

surface de la feuille soit imbibée. Les plantes agroinfiltrées sont ensuite replacées en chambres de culture pendant au moins 4 à 8 jours. L'expression du transgène a généralement lieu entre 2 et 4 jours après l'agroinfiltration.

3.3. Transformation de *P. tricornutum* par conjugaison bactérienne et sélection des mutants

3.3.1. Transformation par conjugaison bactérienne

Les transformations de *P. tricornutum* par la méthode CRISPR-Cas9 ont été réalisées par conjugaison bactérienne, une technique impliquant le transfert d'un épisode (ici, l'épisode PtPuc3_diaCas9_sgRNA) de la bactérie vers la cellule de *P. tricornutum*. Les bactéries utilisées sont les bactéries compétentes pour la conjugaison *E. coli* EPI300 portant un plasmide nommé pTA-Mob (Karas et al., 2015). Ce plasmide contient toute la machinerie nécessaire au transfert des épisodes contenant une origine de transfert (oriT), dont le PtPuc3_diaCas9_sgRNA (**Figure 30**).

Pour préparer les cellules de *P. tricornutum* à la conjugaison bactérienne, une culture en phase exponentielle de *P. tricornutum* est concentrée par centrifugation à 3000 *g* pendant 15 minutes et suspendue dans 100 μ L de milieu ESAW (volume pour une transformation) pour atteindre une concentration de $5 \cdot 10^8$ cellules/mL. Ensuite, 100 μ L de cette culture est étalée de manière uniforme sur un milieu solide spécifiquement conçue pour la conjugaison (45% de milieu ESAW, 1% d'agar, 5% de milieu LB) et contenu dans des plaques de culture cellulaire à 6 puits. Les plaques sont ensuite incubées toute la nuit à 20°C sous lumière constante. Cette étape est effectuée la veille de la transformation.

Afin de préparer les bactéries compétentes *E. coli* EPI300 pour la conjugaison, ces dernières sont transformées avec l'épisode PtPuc3_diaCas9_sgRNA contenant le sgRNA approprié (sgRNA26, sgRNA27 ou sgRNA4). La méthode de transformation est similaire à celle des *E. coli* NEB5 α . La veille de la transformation, quelques colonies des bactéries *E. coli* EPI300 transformées et étalées sur boîtes agar LB sont inoculées dans 3 mL de milieu LB contenant les antibiotiques appropriés, correspondants aux sélections présentes sur le plasmide pTA-Mob (gentamycine) et PtPuc3_diaCas9_sgRNA (kanamycine). Les cultures sont cultivées sur la nuit à 37°C sous une agitation de 180 rpm. Le lendemain matin (jour de la transformation), les pré-cultures sont repiquées dans une culture fraîche à une DO₆₀₀ de 0,1 dans 12,5 mL de milieu LB contenant les antibiotiques appropriés. Les cultures sont cultivées 3 à 4 heures supplémentaires jusqu'à ce qu'elles atteignent une DO₆₀₀ comprise entre 0,8 et 1. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 *g* pendant 15 minutes pour culoter les cellules. Le culot est

resuspendu dans 100 μL de milieu LB préchauffé à 30°C puis remué à l'aide d'un vortex à basse vitesse. La suspension d'*E. coli* est ensuite versée à l'aide d'une pipette p1000 sur les puits contenant les cultures de *P. tricornutum* préalablement étalées. Juste après ce dépôt, les plaques sont fermées et légèrement inclinées pour permettre une distribution homogène de la solution bactérienne dans les puits. Les plaques sont ensuite placées à l'obscurité à 30°C pendant 90 minutes puis replacées en conditions de culture standards à 20°C sous lumière continue pendant 48 heures.

Après 48 heures, 300 μL de milieu ESAW est versé dans chaque puit et un râteau est utilisé pour décrocher les cellules du milieu agar. A l'aide d'une pipette, les 300 μL sont collectés dans un tube eppendorf de 2 mL puis étalés dans une boîte de pétri standard contenant du milieu ESAW agar avec les antibiotiques appropriés (zéocine et carbénicilline). Les colonies apparaissent sur les boîtes entre quatre et cinq semaines après la transformation.

3.3.2. Sélection des transformants

Une fois les colonies apparues, une PCR de criblage est réalisée (**Tableau 4**) en utilisant des amorces spécifiquement conçues pour chaque sgRNA (**Tableau 6**) et qui délimitent une région d'environ 750 nucléotides en amont et en aval du site de clivage de la Cas9 (séquence du sgRNA). 2,5 μL de colonie resuspendue est utilisée pour une réaction PCR. Après migration de 4 μL des réactions PCR sur gel d'électrophorèse et vérification du profil de migration, le restant des réactions PCR (21 μL) est purifié et envoyé pour séquençage (Macrogen) avec une amorce conçue pour s'hybrider à l'intérieur de l'amplikon (**Tableau 6**).

Guide	Amorce sens 5'→3' (criblage)	Amorce anti-sens 5'→3' (criblage)	Taille amplikon	Amorce de séquençage
sgRNA26	GTGTTTGGTGTGGAAAACGG	CATTTTAACCCGTGCCTTGTG	1555 nt	CAGTCCGACGTACTCGTCG
sgRNA27	GTACGCCGTCTTGTCCGTAC	CAGTCCGACGTACTCGTCG	1490 nt	ACCTTCTTGATGGGACCAAAG
sgRNA4	GATACCGGATTTTCACACGC	TGCGAGACATTAGTATGCGC	1564 nt	CACGCTGCAAGTCGTTGTGC

Tableau 6 : Détails des amorces utilisées pour le criblage (colonnes de gauche) des colonies transformées de *P. tricornutum* et le séquençage (colonne de droite) des amplicons purifiés. nt : nucléotide.

Afin d'analyser les profils de mutation des colonies testées, le logiciel ICE (Inference of CRISPR Edits v2) a été utilisé pour détecter et quantifier les taux d'insertion ou de délétion (INDEL). Typiquement, trois différents types de profils de mutation sont observés : des colonies de type sauvage pur (indiquant qu'aucune modification du génome n'a eu lieu), des colonies mosaïques (affichant un mélange de profil sauvage et de profils mutants présentant un ou plusieurs types d'INDEL) ou des colonies mutantes pures (affichant un ou plusieurs types d'INDEL, sans détection du profil de type sauvage). Si une colonie présente un profil intéressant constitué d'un pourcentage relativement élevé d'INDEL, elle est choisie

pour être repiquée puis ré-étalée sur boîte afin d'isoler des colonies filles issues de la colonie mère. Les colonies filles sont analysées de la même manière (PCR de criblage, envoi en séquençage et analyses avec le logiciel ICE) pour détecter une éventuelle augmentation du taux d'INDEL et une diminution du profil sauvage. La même opération est effectuée jusqu'à ce que les colonies présentent un taux d'INDEL de 90 à 100% conjointement à l'absence complète de détection du profil sauvage. La colonie est alors considérée comme un mutant pur.

3.3.3. Informations sur les mutants obtenus

Le profil de mutations des mutants 26I6, 27b1 et 4i1 analysés dans cette étude sont présentés en **figure 32**. Les mutants 26I6 et 4i1 présentent un seul type d'INDEL (une délétion d'un nucléotide pour les deux souches) tandis que le mutant 27b1 est une colonie mosaïque présentant 3 types d'INDEL : une insertion d'un nucléotide et deux délétions différentes de 13 nucléotides.

Les mutations ont généré un décalage de phase de lecture, aboutissant à l'apparition d'un codon stop prématuré sur la séquence du gène. Les séquences des protéines tronquées sont présentées dans le **tableau 7**.



Figure 32 : Détails des mutations générées sur les mutants 2616, 27b1 et 4i1. La localisation schématique des sgRNA sur le gène *PtBTA1* est représentée dans la partie haute de la figure. Les résultats du profil des mutants obtenus avec le logiciel ICE sont représentés dans la partie basse, avec notamment la séquence du sgRNA, la séquence PAM, le pourcentage d'INDEL (Indel %), le R² représentant la robustesse du résultat (au plus proche de 1), ainsi qu'un encart représentant le ou les nucléotide(s) mutés. -1, -13 : délétion, +1 : insertion.

WT	MIASLKRSRFDVMDTVTRAGMEALGRLDYKSPYALTAVGLVGAFSLRNVLQKKFANLIDTICNRTYIYNICWEDPAVDHEILKIQPDDVIFRICSGADIVLDYAIIEGPAKIVVCDMNQHLWLWLFELKIRMLRDPHLYDEWVAIWGSSDVLVAMKVWKRMRHTMSAGGRVWWDGRIERVFRNGYATSGSCGFAAKHLIPWLMWVVGFDVKAWADTGFSHAYISENSHIIENSAWWFRRIIFPGILAPFAGVPPNQIGPEFYTFEFYEGILREIFLDPDFGKDNFYRFYEEKGYKDQTCPPRTLKPKQYFDALRANAGCFEWHHTATVQETMERVKPYSFTKLVLDDHMDWMPNSLVHEEWIALQRSTVPGAKVLWRSFAFTKMDEKPFNNLDITDLSPEWYHKDRVKMYPGTFSCMLPADPFPFVDEPEPSCQRATFTRKLKTTTKMILHPLTAGRVNAHGDKMSSFYASQAKGYDAVRENMLVSRPEMMSGFGPIKKGHTWLDVGGGTGRNLHYLRAQLDLFERIVVLDICPELLAIGEENARLSFTPAQTAKISWVWLDINDKDVRSLAKHLHNDLQRGFDTISFSYLSMIPAWEQALLSARSLMSADGRVIVSDFDYTEAGKSFKDFLIRTWYRQDGVRIESKSRDFIANNVFGGTNFAVTMARFQRKLGGVKIPHYVACCRKETVTESDGKRRPSAIDLTALGEEKTD*	715 AA
2616	MIASLKRSRFDVMDTVTARAWKPLVVSTTSLPTSPQSVSSEPLVSATSCRKSSPTSLTPSATAPTFTTFAGKIPPSTTRSSRFNRTTSFSAFAVPGISCSITPLKDPKLSAT*	116 AA
27b1	MIASLKRSRFDVMDTVTRAGMEALGRLDYKSPYALTAVGLVGAFSLRNVLQKKFANLIDTICNRTYIYNICWEDPAVDHEILKIQPDDVIFRICSGADIVLDYAIIEGPAKIVVCDMNQHLWLWLFELKIRMLRDPHLYDEWVAIWGSSDVLVAMKVWKRMRHTMSAGGRVWWDGRIERVFRNGYATSGSCGFAAKHLIPWLMWVVGFDVKAWADTGFSHAYISENSHIIENSAWWFRRIIFPGILAPFAGVPPNQIGPEFYTFEFYEGILREIFLDPDFGKDNFYRFYEEKGYKDQTCPPRTLKPKQYFDALRANAGCFEWHHTATVQETMERVKPYSFTKLVLDDHMDWMPNSLVHEEWIALQRSTVPGAKVLWRSFAFTKMDEKPFNNLDITDLSPTGLKCTPARSRASCRQLSPLSPNHRPVPNEPLLANSKPPPR*	441 AA
411	MIASLKRSRFDVMDTVTRAGMEALGRLDYKSPYALTAVGLVGAFSLRNVLQKKFANLIDTICNRTYIYNICWEDPAVDHEILKIQPDDVIFRICSGADIVLDYAIIEGPAKIVVCDMNQHLWLWLFELKIRMLRDPHLYDEWVAIWGSSDVLVAMKVWKRMRHTMSAGGRVWWDGRIERVFRNGYATSGSCGFAAKHLIPWLMWVVGFDVKAWADTGFSHAYISENSHIIENSAWWFRRIIFPGILAPFAGVPPNQIGPEFYTFEFYEGILREIFLDPDFGKDNFYRFYEEKGYKDQTCPPRTLKPKQYFDALRANAGCFEWHHTATVQETMERVKPYSFTKLVLDDHMDWMPNSLVHEEWIALQRSTVPGAKVLWRSFAFTKMDEKPFNNLDITDLSPEWYHKDRVKMYPGTFSCMLPADPFPFVDEPEPSCQRATFTRKLKTTTKMILHPLTAGRVNAHGDKMSSFYASQAKGYTRSVKTCWFLDRK*	487 AA

Tableau 7 : Séquences de la protéine BTA1 chez la souche sauvage (WT) et les mutants générés. La taille en acide aminés (AA) est indiquée dans la colonne de droite. L’astérisque symbolise le codon stop.

4. Analyses lipidiques

L’ensemble des analyses lipidiques est réalisé sur la plateforme d’analyses des lipides (LIPANG, LPCV, Grenoble) dirigée par Juliette Jouhet.

4.1. Extraction des glycérolipides par la méthode de Folch

Les extractions de lipides ont été effectuées à partir des échantillons congelés des plantules (*cf.* section 1.1.3.) et des cals (*cf.* section 1.1.5.) d’*A. thaliana*, des feuilles infiltrées de *N. benthamiana* (*cf.* section 1.2.2.) et de leur fractionnement subcellulaire (*cf.* section 5.2.), ainsi que des cellules de *P. tricornutum* (*cf.* section 1.5.4.). La méthode de Folch (Folch et al., 1957) est utilisée.

Les échantillons conservés à -80°C sont lyophilisés (Christ Alpha 2-4 LDplus) sur la nuit avant l’extraction afin d’éliminer l’eau résiduelle et inactiver l’activité des lipases. Les échantillons sont ensuite 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 puis dissous dans 4mL d’éthanol 100% bouillant. Les tubes sont

incubés 5 minutes à 90°C, ce qui permet d'inactiver totalement les enzymes de type lipases. 2 mL de méthanol puis 8 mL de chloroforme sont ajoutés séquentiellement dans les tubes. Ces derniers sont ensuite placés sous un flux d'argon quelques instants pour créer une atmosphère inerte empêchant l'oxydation des lipides au contact de l'air. Les échantillons sont laissés 1h à température ambiante puis filtrés à travers une laine de quartz pour retenir les débris cellulaires dans un nouveau tube corex. Le tube corex et les résidus sont rincés et filtrés par ajout de 3mL de chloroforme/méthanol (2 :1, v/v). La formation d'une bi-phase est ensuite générée par addition de 5mL de solution saline NaCl 1% (poids/poids). Les échantillons sont de nouveau soumis à un bullage sous argon pendant 1 minute pour mélanger les phases 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 du tube 3 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.

4.2. Méthanolyse des acides gras

La méthanolyse est une réaction de 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 (voir section 4.3.) et permettent d'estimer la quantité totale d'acides gras composant un échantillon.

Selon les expériences, la méthanolyse a été réalisée manuellement ou à l'aide d'un robot (RIC) permettant d'automatiser le procédé mais respectant le même principe. Le protocole réalisé manuellement est le suivant : les lipides secs conservés à -20°C sont resuspendus dans 1mL de chloroforme stabilisé à l'éthanol (chloroforme, Puriss. p.a., Reag. ISO, Reag. Ph. Eur., 99,0-99,4% (GC), Honeywell) et 50 µL sont mélangés avec 5 µg de standard interne (C15:0, un acide gras à chaîne impaire saturée contenant 15 carbones) et 3 mL d'acide sulfurique à 2,5% dans du méthanol dans des tubes en verre scellables. La réaction de méthanolyse a lieu à 100°C pendant 1 heure. Tandis que l'environnement acide et la température élevée catalysent la réaction de transestérification, l'excès de méthanol et l'absence d'eau déplacent l'équilibre de la réaction vers la formation des FAME. Les tubes sont laissés à refroidir pendant 5 minutes à température ambiante avant l'ajout de 3 mL d'eau pour arrêter la réaction. Pour récupérer les FAME hydrophobes, 3 mL d'hexane sont ajoutés, les tubes sont soigneusement mélangés et les phases se forment pendant au moins 20 minutes. La phase organique supérieure contenant les FAME est collectée et l'étape de séparation des phases est répétée. Les phases d'hexane collectées sont évaporées sous argon et les FAME peuvent être stockés à -20°C.

4.3. 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, de diamètre interne de 0,22 mm et d'une 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 en fonction du 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 du 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 automatisés grâce à un logiciel développé par Sylvaine Roy au laboratoire.

4.4. Séparation et identification des glycérolipides par TLC

Après quantification des acides gras par GC-FID, une chromatographie sur couche mince (TLC) a été réalisée avec les lipides extraits des feuilles infiltrées de *N. benthamiana* (cf. Chapitres 1 et 2) ou des cultures de *P. tricornutum* (cf. Chapitres 2). La détection du DGTS dans les échantillons a été réalisée par une TLC à une dimension (TLC-1D). Pour pouvoir éventuellement détecter du DGHS et pour améliorer la séparation des lipides, les échantillons de *P. tricornutum* ont été analysés par une TLC à deux dimensions (TLC-2D) afin d'obtenir une meilleure séparation et distinction entre les différents lipides.

Les lipides sont séparés sur une plaque de verre recouverte d'une couche mince de silice (TLC Silica gel 60, 20cm*20cm). Des solvants de migration sont préparés 25 minutes avant le dépôt des lipides sur la plaque. Pour une TLC-1D, seul le solvant de migration « sens 2 » est préparé. Pour une TLC-2D, les deux solvants « sens 1 » et « sens 2 » sont préparés. La composition des solvants est détaillée dans le **tableau 8**.

Solvant de migration	Volume pour une cuve (Sens 1)	Volume pour une cuve (Sens 2)
CHCL3	65 mL	50 mL
MeOH	25 mL	10 mL
H ₂ O	4 mL	5 mL
Acétone	-	20 mL
Acide Acétique	-	10 ml (20 ml pour <i>P. tricornutum</i>)

Tableau 8 : Composition des solvants de migration pour le sens 1 et 2. CHCL3 : chloroforme. MeOH : méthanol.

Un volume équivalent à 300 µg de lipides secs conservés à -20°C est prélevé et transféré dans un tube en verre. Après séchage sous argon, 40 µL de chloroforme sont ajoutés le long des parois du tube pour reprendre l'entièreté de l'échantillon. Une pipette pasteur en verre à embout plat est immergée dans le tube puis mise en contact sur le point de dépôt de l'échantillon de la plaque pour déposer les lipides solubilisés par capillarité. La même opération est effectuée deux fois de suite avec 20 µL de chloroforme. Entre chaque dépôt, les lipides déposés sur la plaque sont séchés avec un flux très léger d'argon.

Pour une TLC-1D, la plaque est déposée verticalement dans une cuve en verre contenant le solvant de migration « Sens 2 » pendant 1 heure et 20 minutes, jusqu'à ce que le solvant migre jusqu'à 2,5 cm du haut de la plaque. Pour une TLC-2D, la plaque est déposée verticalement dans une cuve en verre contenant le solvant de migration « Sens 1 » pendant 1 heure et 30 minutes, jusqu'à ce que le solvant migre jusqu'à 2,5 cm du haut de la plaque. La plaque est séchée sous sorbonne environ 20 minutes puis placée sous une cloche à vide sous flux d'argon pendant 15 minutes afin de la déshydrater et de prévenir les oxydations. La migration dans le solvant « sens 2 » est réalisée 12 heures après la première migration.

Les plaques sont ensuite pulvérisées sous sorbonne avec de l'ANS (Anilino-Naphtalène-Sulfonate 0,2 %, poids/vol, c'est-à-dire 0.2 g d'ANS dans 100 ml de MeOH) et séchées 10 minutes. La visualisation des lipides se fait sous lumière UV avec un détecteur Visualizer (CAMAG).

4.5. Quantification des glycérolipides par HPLC-MS/MS

Les échantillons sont séparés par chromatographie en phase liquide (LC), détectés et quantifiés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

A partir des échantillons de lipides conservés à -20°C, un volume correspondant à 25nmol d'acide gras (déterminé par GC-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 diol de 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 1M, 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⁻¹. Les différentes classes de glycérolipides sont éluées successivement en fonction de leurs têtes polaires.

L'analyse par spectrométrie de masse est réalisée sur un spectromètre de masse de type triple quadrupole 6460 (Agilent, Santa Clara, USA) équipé d'une source d'ions electrospray de type Jetstream (gaz utilisé : azote) dans les conditions suivantes : température du gaz de séchage, 260°C ; flux du gaz de séchage, 13 L.min⁻¹ ; température du gaz d'enveloppe, 300°C ; flux du gaz d'enveloppe, 11 L.min⁻¹ ; pression du nébuliseur, 25 psi ; tension capillaire, ± 5000 V ; tension de buse, ± 1000 V. L'azote est utilisé comme gaz de collision. Les quadrupôles Q1 et Q3 sont exploités pour la résolution la plus large et la résolution unitaire respectivement. Les analyses de la PC et du DGTA ont été effectuées en mode d'ions positifs en recherchant des précurseurs de m/z 184, 236 et aux énergies de collision (CE) de 34 eV et 52 eV respectivement. L'analyse du SQDG est réalisée en mode ion négatif par balayage des précurseurs de m/z -225 à CE de -56 eV. Les mesures des PE, PI, PG, MGDG et DGDG sont effectuées en mode ions positifs en recherchant des pertes de neutres de 141 Da, 277 Da, 189 Da, 179 Da et 341 Da aux CE de 20 eV, 12 eV, 16 eV, 8 eV et 8 eV, respectivement. La quantification est effectuée en utilisant un suivi de réaction multiple (MRM – Multiple Reaction Mode) avec un temps de séjour de 40 ms. Les spectres de masse ont été traités par le logiciel MassHunter Workstation (Agilent, Santa Clara, USA) pour l'identification et la quantification des lipides. Les quantités de lipides (pmol) sont corrigées pour les différences de réponse entre les standards internes et les lipides endogènes et par comparaison avec un contrôle qualité (QC). Pour les analyses réalisées sur *A. thaliana* et *N. benthamiana*, le QC a été réalisé avec un mélange de lipides extraits de cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* et d'*A. thaliana* qualifiés et quantifiés par TLC et GC-FID (Jouhet et al., 2017). Pour les analyses de *P. tricornutum*, l'extrait du QC correspond à un extrait de lipides de *P. tricornutum* qualifié et quantifié par TLC et GC-FID (Jouhet et al., 2017).

5. Analyses des plantes de *N. benthamiana* transformées de manière transitoire

5.1. Observations microscopiques

5.1.1. Microscopie confocale

La microscopie confocale à balayage laser est réalisée sur un microscope Zeiss LSM880 équipé d'un objectif Plan-Apochromat à immersion dans l'huile de 63x/1,4 et utilisant le logiciel d'acquisition Zen 2.3 SP1 (Plateforme μ Life, IRIG, LPCV). La protéine fluorescente verte (GFP) est excitée à 488 nm à des capacités laser entre 1,5 % et 10 %, et sa fluorescence est détectée entre 493 nm et 570 nm avec un détecteur à tube photomultiplicateur réglé entre 700V et 800V. La protéine fluorescente rouge (RFP) est excitée à 561 nm à une capacité laser entre 1,5 et 10% et sa fluorescence est détectée entre 582 nm et 622 nm avec un détecteur à tube photomultiplicateur réglé entre 600 et 800V. 10 images sont prises aléatoirement sur l'ensemble de l'échantillon foliaire, prélevé sur deux plantes indépendantes. Trois réplicats biologiques sont réalisés, aboutissant à l'obtention de 30 images par échantillon. Les images sont visualisées et traitées avec le logiciel ImageJ 1.53a utilisant le logiciel de traitement d'image Fiji (<https://imagej.net/Fiji>).

5.1.2. Quantification de la fluorescence

La quantification du niveau de fluorescence détecté sur les images de microscopie confocale est réalisé à l'aide du logiciel Fiji. 30 images issues de trois réplicats indépendants sont analysées pour chaque échantillon. La fluorescence est estimée grâce au calcul de la détermination de la fluorescence totale corrigée (CTCF, Corrected Total Cell Fluorescence) selon la formule suivante : $CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background readings})$. Cette formule permet de quantifier la fluorescence détectée sur l'ensemble de l'image en éliminant les régions non fluorescentes présentant un bruit de fond (background readings).

5.1.3. Microscopie électronique à transmission

Les feuilles infiltrées de *N. benthamiana* sont préparées comme décrit précédemment (Flori et al., 2018). Les échantillons sont fixés dans un tampon phosphate (PB) 0,1 M (pH 7,4) contenant 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde pendant 1 heure à température ambiante, sous vide à l'aide d'un dessiccateur, puis conservés toute la nuit à 4 °C. Les échantillons sont ensuite lavés cinq fois dans du PB 0,1 M (pH 7,4), le tampon étant retiré directement par pipetage. Les échantillons sont fixés par une incubation de 2 heures sur glace dans du PB 0,1 M (pH 7,4) contenant 2 % d'osmium et 1,5 % de ferricyanure de potassium avant d'être lavés cinq fois avec du PB 0,1 M (pH 7,4). Les échantillons sont incubés dans du PB 0,1 M (pH 7,4) contenant 0,1 % d'acide tannique et incubés pendant 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante. Les échantillons sont de nouveau lavés cinq fois avec du PB 0,1 M (pH 7,4),

déshydratés dans des concentrations croissantes d'éthanol, et infiltrés avec un mélange éthanol/résine EMBED-812. Enfin, les échantillons sont enrobés dans de l'EMBED-812. Des sections ultrafines (70–100 nm) sont préparées avec un couteau en diamant sur un ultramicrotome PowerTome (RMC products, Tucson, AZ, USA) et collectées sur des grilles de cuivre de 200 Mesh. Les échantillons sont visualisés par microscopie électronique en transmission par balayage (STEM) en utilisant un microscope FEI Tecnai (FEI, USA) configuré à 200 KV. Pour les films supplémentaires (cf. lien indiqué dans le chapitre 1) et les reconstitutions 3D (cf. chapitre 1), la tomographie par faisceau d'ions focalisé (FIB) est réalisée avec un microscope Zeiss CrossBeam 550 (Zeiss, Allemagne), équipé du logiciel Fibics Atlas 3D pour la tomographie, décrit précédemment (Uwizeye et al., 2021). Le bloc de résine contenant les cellules est fixé sur un plot avec une pâte d'argent, et la surface est abrasée avec un couteau en diamant dans un microtome pour obtenir une surface parfaitement plate et propre. L'échantillon entier est métallisé avec 4 nm de platine. À l'intérieur du FIB-SEM, une seconde couche de platine (1-2 μm) est déposée localement sur la zone analysée. L'échantillon est ensuite abrasé tranche par tranche avec le faisceau d'ions Ga⁺ (généralement avec un courant de 700 nA à 30 kV). Chaque surface fraîchement exposée est imagée par microscopie électronique à balayage (SEM) à 1,5 kV et avec un courant d'environ 1 nA en utilisant le détecteur de rétrodiffusion EsB de la colonne. Le mode simultané de fraisage et d'imagerie est utilisé pour une meilleure stabilité, avec une correction automatique de la mise au point et de l'astigmatisme toutes les heures. Pour chaque tranche, une épaisseur de 6 nm est retirée, et les images SEM sont enregistrées avec une taille de pixel de 6 nm, fournissant une taille de voxel isotrope de 6 × 6 × 6 nm³. À partir de la pile alignée FIB-SEM, la région d'intérêt représentant la cellule est recadrée pour éliminer le fond inutile en utilisant le logiciel Fiji (<https://imagej.net/Fiji>). La segmentation 3D, les reconstructions et la visualisation sont réalisées à l'aide du logiciel Dragonfly (www.theobjects.com/dragonfly). Les surfaces et les volumes sont directement calculés à partir du logiciel Dragonfly.

5.2. Purification des chloroplastes

4 jours après leur agroinfiltration, les plantes de *N. benthamiana* sont pré-incubées sur la nuit à 4°C. Toutes les étapes de la purification des chloroplastes s'effectuent en chambre froide (4°C), sur de la glace ou dans des centrifugeuses pré-réfrigérées à 4°C. La veille de la purification, un tampon de broyage et un tampon de lavage sont réalisés. Les composants de ces tampons sont détaillés dans les **tableaux 9** et **10**. Deux gradients de percoll par échantillon sont également réalisés. 60 mL de tampon de lavage sont mélangés à 60 mL de Percoll 100%. 30 mL du mélange sont déposés dans les tubes de centrifugation de 38 mL. Après équilibrage des tubes, ceux-ci sont centrifugés 55 minutes à 39191 g

(rotor JA20) (slow en montée de vitesse, brake off en descente de vitesse). Les gradients formés sont conservés à 4°C.

Composants (concentrations initiales)	Quantité pour 200 mL de tampon (concentrations finales)
Sorbitol 0.4 M	14,6 g
Tricine /KOH (20mM) pH 8.4	4 mL (1M)
EDTA pH 8.0 10mM	4 mL (0,5M)
NaHCO ₃ 10 mM	0,17 g
Ajuster pH 8.4	-
BSA (0.15 %) ajoutée le jour de la manipulation	0,3 g

Tableau 9 : Composition du tampon de broyage.

Composants (concentrations initiales)	Quantité pour 200 mL de tampon (concentrations finales)
Sorbitol 0.8 M	29,15 g
Hepes /KOH (40 mM) pH 7.6	8 mL (1M)
MgCl ₂ 10 mM	2 mL (1M)
EDTA (5 mM) pH 8	2 mL (0,5M)
NaHCO ₃ (20 mM)	0,34 g
Ajuster pH 7.6 (avec KOH)	-

Tableau 10 : Composition du tampon de lavage.

Le jour de la purification des chloroplastes, 3 à 4 g de feuilles sont coupés et mixés dans un Blender dans 70 mL de tampon de broyage. La solution de mixage est filtrée sur 4 épaisseurs de gaze placées sur une toile à buter. 1 mL de filtrat obtenu (500 µL pour l'analyse lipidique et 500 µL pour l'analyse protéique) est collecté et stocké à -80°C en tant que fraction totale. Le restant du filtrat est récupéré dans des tubes de centrifugation de 38 mL et centrifugé 2 minutes à 2070 g (rotor JA20). Le surnageant est récupéré et le culot conservé sur la glace.

Le surnageant est centrifugé pendant 1 heure à 4°C à 177583 g dans un rotor SW40. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 1 mL de tampon de lavage. Le surnageant resuspendu est ensuite récupéré (500 µL pour l'analyse lipidique et 500 µL pour l'analyse protéique) et conservé à -80°C en tant que fraction contenant les membranes extraplastidiales.

Le culot ayant été conservé sur la glace est resuspendu dans 3 mL de tampon de lavage et déposé avec une pipette p100 sur le gradient de Percoll précédemment réalisé. Le tout est centrifugé 10 minutes à 9798 g dans un rotor JS13.1 (slow en montée de vitesse, brake off en descente de vitesse). La bande inférieure contenant les chloroplastes purifiés intacts est prélevée et diluée dans 38 mL de tampon de

lavage puis centrifugée 5 minutes à 1482 *g* dans un rotor JA20. Le surnageant est retiré et le culot resuspendu dans 1 mL de tampon de lavage. La solution est récupérée (500 μ L pour l'analyse lipidique et 500 μ L pour l'analyse protéique) et conservée à -80°C en tant que fraction des chloroplastes purifiés.

5.3. Quantification de l'amidon

La quantification de l'amidon est réalisée à l'aide du kit d'extraction d'amidon Starch Assay kit de Sigma-Aldrich® (SA20). Les feuilles des plantes de *N. benthamiana* (2 feuilles par plante) sont récoltées 4 et 8 jours après l'agroinfiltration et directement congelées dans de l'azote liquide. Après broyage à l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon, 5 mL d'éthanol 80% sont ajoutés aux échantillons placés dans des tubes Corex de capacité 35mL. Les tubes sont placés au bain-marie à 85°C pendant 5 minutes. Après homogénéisation des tubes, 5 mL d'éthanol 80% supplémentaires y sont ajoutés. Une centrifugation de 10 minutes à 1000 *g* est ensuite réalisée. Les étapes suivantes sont effectuées selon les instructions du fabricant. Pour la détermination de la quantité de glucose, une gamme étalon est réalisée en mesurant la densité optique à 540 nm de solutions croissantes de glucose en utilisant 10, 20, 30, 40 et 50 μ g du réactif de standard de glucose (glucose standard reagent) du kit. Le DO_{540} est également réalisée sur les échantillons. La quantité de glucose (μ g/mg de poids frais) des échantillons peut alors être calculée grâce à l'équation de la droite générée par la gamme étalon de glucose.

5.4. Analyse de l'activité photosynthétique

Les mesures de fluorescence de la chlorophylle sont effectuées sur des plantes de *N. benthamiana* 4 jours après leur agroinfiltration, à température ambiante. 4 plantes par mesure sont analysées en utilisant un dispositif d'imagerie de fluorescence de la chlorophylle Speedzen 3 (JBeamBio, La Rochelle, France). Avant l'analyse, les plantes sont adaptées à l'obscurité pendant 30 minutes. Dans ce dispositif, la lumière actinique et les impulsions de saturation sont générées par des LED rouges avec un pic à 630 nm, tandis que les impulsions de mesure (d'une durée de 250 ms) sont émises par des LED bleues avec un pic à 470 nm. Le temps de détection suivant chaque impulsion de mesure est fixé à 15 μ s. La valeur de fluorescence rapportée est une moyenne obtenue à partir de 10 points différents sur diverses feuilles, chacun constitué de quatre pixels. L'efficacité quantique maximale du photosystème II (PSII) a été calculée suivant la formule suivante : $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$; où F_o et F_m sont les émissions de fluorescence mesurées respectivement avant et à la fin d'une impulsion de saturation de 200 ms, dans des feuilles adaptées à l'obscurité. Φ_{PSII} est calculé selon la formule suivante : $(F_m' - F)/F_m'$; F étant la fluorescence à l'état stationnaire atteinte en présence d'une illumination par la lumière actinique et F_m' étant l'émission de fluorescence mesurée à la fin d'une impulsion de saturation de 200 ms, dans des feuilles adaptées à la lumière. Le taux de transport d'électrons (ETR, Electron Transport Rate) a été

calculé suivant la formule suivante : $0,6 \times \text{PAR} \times \Phi_{\text{PSII}}$; où 0,6 correspond au rapport moyen des centres de réaction du PSII aux centres de réaction du photosystème I (PSI) et PAR (Photosynthetically Active Radiation) correspond au niveau d'irradiation de la lumière dans la gamme PAR (400 nm à 700 nm) en $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. L'extinction non photochimique (NPQ) est enregistrée pendant 5 minutes d'illumination à $672 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ suivie de 5 minutes d'obscurité. Le NPQ est calculé selon la formule suivante : $(F_m - F_m')/F_m'$ (Maxwell & Johnson, 2000). Les données sont obtenues à partir de trois réplicats indépendants regroupant trois échantillons biologiques de plantes.

5.5. Analyses des protéines

5.5.1. Extraction des protéines

L'extraction des protéines est réalisée à partir des feuilles infiltrées de *N. benthamiana* conservées à -80°C ou à partir des différentes fractions récoltées pendant la purification de chloroplastes (cf. section 5.2.). Dans le cas de l'analyse des feuilles entières, ces dernières sont broyées à l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. La poudre est récoltée et pesée (environ 100 mg) dans un tube eppendorf de 1,5 mL qui est conservé sur la glace. Les fractions issues de la purification de chloroplastes sont décongelées sur la glace et utilisées telles quelles pour la suite de la manipulation.

Pour les feuilles broyées, 200 μL de tampon d'extraction (8M d'Urée, 50 mM de Tris-HCl pH6.8, 1 mM d'EGTA ainsi qu'1 mM de DTT ajouté extemporanément) sont ajoutés dans les tubes. Pour les fractions issues des purifications de chloroplaste, 500 μL de tampon d'extraction sont ajoutés. A l'aide d'une pipette p200, l'échantillon est resuspendu par environ 30 aspirations/refoulements. Les tubes sont chauffés 5 minutes à 70°C dans un bloc chauffant sous une agitation de 500 rpm puis centrifugés 5 minutes à $5000 g$ à 4°C . Le surnageant est prélevé et transféré dans un nouveau tube de 1,5 mL. Cette solution est ensuite utilisée pour le dosage des protéines par le test de Bradford.

5.5.2. Dosage des protéines extraites

Le dosage des protéines est réalisé par le test colorimétrique de Bradford (Bio-Rad). Le colorant (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) est dilué 5 fois dans de l'eau et distribué dans des cuvettes de spectrophotométrie. Entre 1 et 3 μL de protéines extraites sont diluées dans le colorant et homogénéisées. Parallèlement, une gamme d'étalonnage contenant 0, 2, 4, 6, 8 et 10 μg de BSA (stock à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) diluée dans le colorant est réalisée dans les cuvettes de spectrophotométrie. Les absorbances des échantillons et des gammes de BSA sont lues à 595 nm. La concentration en protéines est ensuite déterminée en utilisant l'équation de la droite obtenue par les standards de BSA.

5.5.3. Migration des protéines sur gel dénaturant SDS-PAGE

Les protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, ce qui permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Un volume équivalent à une quantité de 10 à 30 µg de protéines est mélangé à un tampon dénaturant concentré quatre fois (LDS (4X) NuPAGE™, Life Technologies) et un tampon réducteur concentré dix fois (Sample reducing agent (10X) NuPAGE™, Life Technologies). Ces tampons permettent de charger les protéines négativement et supprimer leur structure tertiaire. Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel de polyacrylamide (NuPAGE™ 4 à 12 % Bis-Tris minigel, Life Technologies). La migration s'effectue avec la cuve Mini Gel Tank (Life Technologies) ; les gels sont placés dans la cuve avec le tampon de migration MES SDS Bolt™, 20X. La migration débute à 100V pendant 5 minutes puis continue à 120V jusqu'à ce que les protéines aient migré dans le bas du gel, soit environ 1h. Un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BioRad) est également chargé sur le gel pour évaluer les masses moléculaires des protéines.

5.5.4. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines depuis le gel de polyacrylamide est réalisé sur membrane de nitrocellulose (Amersham Protran 0.2 µm). Un assemblage comportant du papier absorbant (papier Whatman) et une membrane de nitrocellulose découpés aux mêmes dimensions que le gel de polyacrylamide est réalisé et placé dans une cuve d'électrophorèse Mini Gel Tank (Invitrogen). Le gel est positionné au pôle chargé négativement tandis que la membrane de nitrocellulose est placée vers le pôle positif afin de permettre la migration des protéines chargées négativement depuis le gel vers la membrane. La migration s'effectue dans un tampon de transfert Bolt™ (20X) à 25V pendant 1 heure. 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), acide trichloroacétique 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).

5.5.5. Immunodétection des protéines (Western Blot)

L'immunomarquage est réalisé afin de détecter des protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose. L'anticorps anti-GFP-HRP (130-091-833, Miltenyi Biotec) est utilisée pour détecter les protéines fusionnées à la GFP exprimées transitoirement dans les feuilles de *N. benthamiana*. L'anticorps anti-BIP2 (AS09481, Agrisera) et anti-LHCP sont utilisés pour détecter respectivement des marqueurs du réticulum endoplasmique et des thylakoïdes. L'anticorps anti-LHCP a été généreusement fourni par Olivier Vallon (IBPC, Paris).

L'immunomarquage est réalisée avec la machine automatisée Bandmate Thermofisher avec le cycle ON2AB correspondant à une incubation de 15 heures avec deux anticorps. Les membranes de nitrocellulose sont placées dans la machine dans une solution tampon TBS-lait 5% (p/v) et incubées selon le programme suivant : 7 heures d'incubation dans une solution contenant l'anticorps primaire dilué dans un tampon TBS1X, 0,5% lait, 0,1% Tween, 30 minutes de lavage avec un tampon TBS1X, 0,1% Tween, 6 heures d'incubation dans une solution contenant l'anticorps secondaire dilué dans un tampon TBS1X, 0,5% lait, 0,1% Tween puis 10 minutes de lavage. Toutes les étapes sont effectuées sous agitation douce et à 4°C.

5.5.6. Révélation de la membrane

La révélation des membranes est réalisée par la 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).

6. Analyses phénotypiques des cellules de *P. tricornutum*

6.1. Suivi de croissance

Les suivis de croissance réalisées sur les cellules de *P. tricornutum* sont réalisés en mesurant la concentration cellulaire des cultures liquides pendant 5 jours consécutifs. La détermination de la concentration cellulaire des cultures est réalisée par lecture de l'absorbance à 730 nm à l'aide du spectrophotomètre Tecan® Infinite M1000PRO. Une courbe de régression linéaire a été précédemment réalisée au laboratoire (Conte et al., 2018) et permet de corrélérer l'absorbance à 730 nm avec la concentration cellulaire. La formule de régression linéaire obtenue est la suivante :

$$y = 1,834 \cdot 10^{-8}x + 0,03758$$

y = absorbance à 730 nm et x = concentration cellulaire en millions de cellules par mL.

Un volume de 300 µL de culture est déposé dans une plaque 96 puits à fond transparent (Thermo Fisher Scientific, Référence 142010) avant d'être lue par le spectrophotomètre. 2 puits par échantillons sont utilisés à chaque mesure.

6.2. Observations microscopiques

Les 300 μ L de cultures prélevées lors des suivis de croissance sont utilisés après la détermination de la concentration cellulaire pour l'observation de la morphologie des cellules au microscope optique Zeiss AXIO Observer.A1. Les photographies sont prises avec l'objectif Plan-NEOFLUAR 100x/1,3 à immersion à huile et le filtre Bright Field et traitées avec le logiciel Snap Zen Lite 2012.

7. Présentation des résultats et analyses statistiques

L'ensemble des graphiques et des analyses statistiques générés dans cette étude ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.04. Les statistiques obtenues sur les analyses lipidiques et les quantifications de fluorescence ont été réalisées par un test non paramétrique de comparaison deux à deux Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Benjamini, Krieger et Yekutieli. Concernant les mesures de l'efficacité photosynthétique des feuilles de *N. benthamiana* et le suivi de croissance de *P. tricornutum*, les valeurs obtenues ont été préalablement soumises aux tests de normalité de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov. Après validation de la normalité des données, les statistiques ont été réalisées par le test paramétrique d'analyse de la variance (ANOVA) à deux voies suivie du test de comparaison multiple de Tukey.

Références bibliographiques

A

- Abida, H., Dolch, L. J., Meï, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M. A., Finazzi, G., Bastien, O., Tirichine, L., Bowler, C., Rébeillé, F., Petroutsos, D., Jouhet, J., & Maréchal, E. (2015). Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*, *167*(1), 118–136. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252395>
- Andersson, M. X., Larsson, K. E., Tjellström, H., Liljenberg, C., & Sandelius, A. S. (2005). Phosphate-limited oat: The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(30), 27578–27586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503273200>
- Araki, S., Eichenberger, W., Sakurai, T., & Sato, N. (1991). Distribution of Diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl-beta-alanine (DGTA) and Phosphatidylcholine in Brown Algae. *Plant Cell Physiol*, *32*(5), 623–628. <https://academic.oup.com/pcp/article/32/5/623/1939829>
- Archibald, J. M., & Keeling, P. J. (2002). Recycled plastids: A “green movement” in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics*, *18*(11), 577–584. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02777-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02777-4)
- Ashley, K., Mavinic, D., & Koch, F. (2009). *International Conference on Nutrient Recovery from Wastewater Streams (Vancouver, 2009)*. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780401805>
- Awai, K., Maréchal, E., Block, M. A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K. I., Ohta, H., & Joyard, J. (2001). Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(19), 10960–10965. <https://doi.org/10.1073/pnas.181331498>

B

- Babiychuk, E., Müller, F., Eubel, H., Braun, H. P., Frentzen, M., & Kushnir, S. (2003). *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *Plant Journal*, *33*(5), 899–909. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01680.x>
- Bhattacharya, D., & Medlin, L. (1995). The Phylogeny of Plastids: a Review Based on Comparisons of Small-Subunit Ribosomal Rna Coding Regions. *Journal of Phycology*, *31*(4), 489–498. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1995.tb02542.x>

- Billey, E., Magneschi, L., Leterme, S., Bedhomme, M., Andres-Robin, A., Poulet, L., Michaud, M., Finazzi, G., Dumas, R., Crouzy, S., Laueffer, F., Fourage, L., Rebeille, F., Amato, A., Collin, S., Jouhet, J., & Marechal, E. (2021). Characterization of the Bubblegum acyl-CoA synthetase of *Microchloropsis gaditana*. *Plant Physiology*, *185*(3), 815–835. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAA110>
- Block, M. A., Dorne, A. J., Joyard, J., & Douce, R. (1983). Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *Journal of Biological Chemistry*, *258*(21), 13281–13286. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)44113-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)44113-5)
- Block, Maryse A., Douce, R., Joyard, J., & Rolland, N. (2007). Chloroplast envelope membranes: A dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynthesis Research*, *92*(2), 225–244. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9195-8>
- Block, Maryse A., & Jouhet, J. (2015). Lipid trafficking at endoplasmic reticulum-chloroplast membrane contact sites. *Current Opinion in Cell Biology*, *35*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.03.004>
- Bolik, S., Albrieux, C., Schneck, E., Demé, B., & Jouhet, J. (2022). Sulfoquinovosyldiacylglycerol and phosphatidylglycerol bilayers share biophysical properties and are good mutual substitutes in photosynthetic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1864*(12). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184037>
- Bolik, S., Schlaich, A., Mukhina, T., Amato, A., Bastien, O., Schneck, E., Demé, B., & Jouhet, J. (2023a). Lipid bilayer properties potentially contributed to the evolutionary disappearance of betaine lipids in seed plants. *BMC Biology*, *21*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01775-z>
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R. P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., ... Grigoriev, I. V. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, *456*(7219), 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
- Brembu, T., Mühlroth, A., Alipanah, L., & Bones, A. M. (2017). The effects of phosphorus limitation on carbon metabolism in diatoms. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 372, Issue 1728). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0406>
- Bucher, M., Rausch, C., & Daram, P. (2001). Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *164*(2), 209–217. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200104\)164:2<209::AID-JPLN209>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200104)164:2<209::AID-JPLN209>3.0.CO;2-F)

C

- Cañavate, J. P., Armada, I., & Hachero-Cruzado, I. (2017). Interspecific variability in phosphorus-induced lipid remodelling among marine eukaryotic phytoplankton. *New Phytologist*, *213*(2), 700–713. <https://doi.org/10.1111/nph.14179>
- Cannell, N., Emms, D. M., Hetherington, A. J., MacKay, J., Kelly, S., Dolan, L., & Sweetlove, L. J. (2020). Multiple Metabolic Innovations and Losses Are Associated with Major Transitions in Land Plant Evolution. *Current Biology*, *30*(10), 1783-1800.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.086>
- CAVALIER-SMITH, T. (1982). The origins of plastids. *Biological Journal of the Linnean Society*, *17*(3), 289–306. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1982.tb02023.x>
- Cembella, A. D., Antia, N. J., & Harrison, P. J. (1982). The Utilization of Inorganic and Organic Phosphorous Compounds as Nutrients by Eukaryotic Microalgae: A Multidisciplinary Perspective: Part I. *Critical Reviews in Microbiology*, *10*, 317–391. <https://doi.org/https://doi.org/10.3109/10408418209113567>
- Chen, J., Liu, Y., Ni, J., Wang, Y., Bai, Y., Shi, J., Gan, J., Wu, Z., & Wu, P. (2011). OsPHF1 regulates the plasma membrane localization of low- and high-affinity inorganic phosphate transporters and determines inorganic phosphate uptake and translocation in rice. *Plant Physiology*, *157*(1), 269–278. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181669>
- Cheng, L., Bucciarelli, B., Liu, J., Zinn, K., Miller, S., Patton-Vogt, J., Allan, D., Shen, J., & Vance, C. P. (2011). White lupin cluster root acclimation to phosphorus deficiency and root hair development involve unique glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Plant Physiology*, *156*(3), 1131–1148. <https://doi.org/10.1104/pp.111.173724>
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, *229*, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
- Chiou, T. J., & Lin, S. I. (2011). Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 185–206. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103849>
- Ciereszko, I., Johansson, H., Hurry, V., & Kleczkowski, L. A. (2001). Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of Arabidopsis. *Planta*, *212*(4), 598–605. <https://doi.org/10.1007/s004250000424>

- Clarkson, D. T. (1996). Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. second edition. *Annals of Botany*, 78, 527–528. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:85849550>
- Colin, L. A., & Jaillais, Y. (2020). Phospholipids across scales: lipid patterns and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 53, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.08.007>
- Conte, M., Lupette, J., Seddiki, K., Meï, C., Dolch, L. J., Gros, V., Barette, C., Rébeillé, F., Jouhet, J., & Maréchal, E. (2018). Screening for biologically annotated drugs that trigger triacylglycerol accumulation in the diatom *Phaeodactylum*. *Plant Physiology*, 177(2), 532–552. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01804>
- Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Cordell, D., & White, S. (2014). Life's bottleneck: Sustaining the world's phosphorus for a food secure future. *Annual Review of Environment and Resources*, 39, 161–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-010213-113300>
- Cornel, P., & Schaum, C. (2009). Phosphorus recovery from wastewater: needs, technologies and costs. *Water Sci Technol*, 59, 1069–1076. <https://doi.org/https://doi.org/10.2166/wst.2009.045>
- Cruz-Ramírez, A., Oropeza-Aburto, A., Razo-Hernández, F., Ramírez-Chávez, E., & Herrera-Estrella, L. (2006). Phospholipase D22 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in Arabidopsis roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6765–6770. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600863103>
- Cruz de Carvalho, M. H., Sun, H. X., Bowler, C., & Chua, N. H. (2016). Noncoding and coding transcriptome responses of a marine diatom to phosphate fluctuations. *New Phytologist*, 210(2), 497–510. <https://doi.org/10.1111/nph.13787>
- Cubero, B., Nakagawa, Y., Jiang, X. Y., Miura, K. J., Li, F., Raghothama, K. G., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., & Pardo, J. M. (2009). The phosphate transporter PHT4;6 is a determinant of salt tolerance that is localized to the golgi apparatus of Arabidopsis. *Molecular Plant*, 2(3), 535–552. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp013>

D

- De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2004). Recent advances in removing phosphorus from wastewater and

its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Research*, 38(19), 4222–4246.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.07.014>

De Clerck, O., Kao, S. M., Bogaert, K. A., Blomme, J., Foflonker, F., Kwantes, M., Vancaester, E., Vanderstraeten, L., Aydogdu, E., Boesger, J., Califano, G., Charrier, B., Clewes, R., Del Cortona, A., D'Hondt, S., Fernandez-Pozo, N., Gachon, C. M., Hanikenne, M., Lattermann, L., ... Bothwell, J. H. (2018). Insights into the Evolution of Multicellularity from the Sea Lettuce Genome. *Current Biology*, 28(18), 2921-2933.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.015>

de Mendoza, D., & Pilon, M. (2019). Control of membrane lipid homeostasis by lipid-bilayer associated sensors: A mechanism conserved from bacteria to humans. *Progress in Lipid Research*, 76(April), 100996. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.100996>

Degraeve-Guilbault, C., Bréhélin, C., Haslam, R., Sayanova, O., Marie-Luce, G., Jouhet, J., & Corellou, F. (2017). Glycerolipid characterization and nutrient deprivation- associated changes in the green picoalga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiology*, 173(4), 2060–2080.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01467>

Dolch, L. J., & Maréchal, E. (2015). Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Drugs*, 13(3), 1317–1339.
<https://doi.org/10.3390/md13031317>

Douce, R., & Joyard, J. (1990). Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annual Reviews of Cell Biology*, 173–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.06.110190.001133>.

Dubacq, J.-P., & Trémolières, A. (1983). Occurrence and function of phosphatidylglycerol containing Δ^3 -trans-hexadecenoic acid in photosynthetic lamellae. *Physiologie Végétale*, 21, 293–312.

Dubertret, G., Gerard-Hirne, C., & Trémolières, A. (2002). Importance of trans- Δ^3 -hexadecenoic acid containing phosphatidylglycerol in the formation of the trimeric light-harvesting complex in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(10), 829–836.
[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01442-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01442-0)

Dubots, E., Botté, C., Boudière, L., Yamaryo-Botté, Y., Jouhet, J., Maréchal, E., & Block, M. A. (2012). Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie*, 94(1), 86–93.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.03.012>

Dyhrman, S. T., Jenkins, B. D., Rynearson, T. A., Saito, M. A., Mercier, M. L., Alexander, H., Whitney, L. A. P., Drzewianowski, A., Bulygin, V. V., Bertrand, E. M., Wu, Z., Benitez-Nelson, C., & Heithoff, A.

(2012). The transcriptome and proteome of the diatom *thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033768>

E

Eichenberger, W., & Boschetti, A. (1978). Occurrence of 1(3),2-diacylglyceryl-(3)-04'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine in *Chlamydomonas reinhardi*. *FEBS Letters*, 88(2), 201–204. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80173-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80173-2)

Eichenberger, Waldemar, Arak, S., & Mollerj, D. G. (1993). BETAINE LIPIDS AND PHOSPHOLIPIDS IN BROWN ALGAE. In *Phytochemistry* (Vol. 34, Issue 5).

Elser, J. J. (2012). Phosphorus: A limiting nutrient for humanity? *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.03.001>

Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., & Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 10(12), 1135–1142. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x>

Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W., & Ettema, T. J. G. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 711–723. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.133>

Engström, P., Zambryski, P., Van Montagu, M., & Stachel, S. (1987). Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins induced by the plant factor acetosyringone. *Journal of Molecular Biology*, 197(4), 635–645. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90470-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90470-0)

Essigmann, B., Güler, S., Narang, R. A., Linke, D., & Benning, C. (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1 a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1950–1955. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1950>

F

Falciatore, A., Casotti, R., Leblanc, C., Abrescia, C., & Bowler, C. (1999). Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. *Marine Biotechnology*, 1(3), 239–251. <https://doi.org/10.1007/PL00011773>

Falkowski, P. G., Barber, R. T., & Smetacek, V. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean

primary production. *Science*, 281(5374), 200–206.
<https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>

Ferro, M., Salvi, D., Rivière-Rolland, H., Verdat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., & Rolland, N. (2002). Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11487–11492. <https://doi.org/10.1073/pnas.172390399>

Flori, S., Jouneau, P. H., Gallet, B., Estrozi, L. F., Moriscot, C., Schoehn, G., Finazzi, G., & Falconet, D. (2018). Imaging Plastids in 2D and 3D: Confocal and Electron Microscopy. In *Plastids: Methods and Protocols*. (pp. 113–122). Springer US. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8654-5_7

Flügge, U. I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., & Eckerskorn, C. (1989). The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *The EMBO Journal*, 8(1), 39–46. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03346.x>

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.

FRENTZEN, M., HEINZ, E., McKEON, T. A., & STUMPF, P. K. (1983). Specificities and Selectivities of Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase and Monoacylglycerol-3-Phosphate Acyltransferase from Pea and Spinach Chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 129(3), 629–636. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07096.x>

G

Gaude, N., Nakamura, Y., Scheible, W. R., Ohta, H., & Dörmann, P. (2008). Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 56(1), 28–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03582.x>

Gibellini, F., & Smith, T. K. (2010). The Kennedy pathway-de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. In *IUBMB Life* (Vol. 62, Issue 6, pp. 414–428). <https://doi.org/10.1002/iub.337>

Gilmour, D. J. (2019). Chapter One - Microalgae for biofuel production. *Advances in Applied Microbiology*, 109, 1–30.

Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science*, 283. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011403>

Gray, M. W., & Spencer, D. (1996). Organellar evolution. *Evolution of Microbial Life, Society fo*, 109–126.

Guéguen, N. (2022). *Characterisation of monogalactosyldiacylglycerol synthases in the model diatom Phaeodactylum tricornutum*. [Grenoble Alpes]. <https://theses.hal.science/tel-03771822>

Guo, B., Jin, Y., Wussler, C., Blancaflor, E. B., Motes, C. M., & Versaw, W. K. (2008). Functional analysis of the Arabidopsis PHT4 family of intracellular phosphate transporters. *New Phytologist*, 177(4), 889–898. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02331.x>

Guschina, I. A., Harwood, J. L., Smith, M., & Beckett, R. P. (2002). Abscisic acid modifies the changes in lipids brought about by water stress in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytologist*, 156(2), 255–264. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00517.x>

H

Hagio, M., Sakurai, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Wada, H. (2002). Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 43(12), 1456–1464. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf185>

Hamel, P., Saint-Georges, Y., De Pinto, B., Lachacinski, N., Altamura, N., & Dujardin, G. (2004). Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Microbiology*, 51(2), 307–317. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03810.x>

Hamilton, M. L., Warwick, J., Terry, A., Allen, M. J., Napier, J. A., & Sayanova, O. (2015). Towards the industrial production of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids from a genetically modified diatom *phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE*, 10(12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144054>

Hammond, J. P., Broadley, M. R., & White, P. J. (2004). Genetic responses to phosphorus deficiency. *Annals of Botany*, 94(3), 323–332. <https://doi.org/10.1093/aob/mch156>

Harayama, T., & Shimizu, T. (2020). Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. *Journal of Lipid Research*, 61(8), 1150–1160.

<https://doi.org/10.1194/JLR.R120000800>

Hirashima, T., Toyoshima, M., Moriyama, T., & Sato, N. (2018). Evolution of the Phosphatidylcholine Biosynthesis Pathways in Green Algae: Combinatorial Diversity of Methyltransferases. *Journal of Molecular Evolution*, *86*(1), 68–76. <https://doi.org/10.1007/s00239-017-9826-4>

Howe, C. J., Barbrook, A. C., Nisbet, R. E. R., Lockhart, P. J., & Larkum, A. W. D. (2008). The origin of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1504), 2675–2685. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0050>

Huang, B., Marchand, J., Thiriet-Rupert, S., Carrier, G., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Moreau, B., Morant-Manceau, A., Bougaran, G., & Mimouni, V. (2019). Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta). *Algal Research*, *40*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101506>

Huang, T., Pan, Y., Maréchal, E., & Hu, H. (2023). Proteomes reveal the lipid metabolic network in the complex plastid of *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.16477>

Hyvönen, M. T., Rantala, T. T., & Ala-Korpela, M. (1997). Structure and dynamic properties of diunsaturated 1-palmitoyl-2- linoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine lipid bilayer from molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, *73*(6), 2907–2923. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78319-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78319-X)

J

Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C. A., Lutes, J., Benning, C., & Chory, J. (2000). Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(14), 8175–8179. <https://doi.org/10.1073/pnas.100132197>

Jia, J., Han, D., Gerken, H. G., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q., & Xu, J. (2015). Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. *Algal Research*, *7*, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.005>

Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N. P., & Fu, X. (2007). Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *145*(4), 1460–1470. <https://doi.org/10.1104/pp.107.103788>

Jónasdóttir, S. H. (2019). Fatty acid profiles and production in marine phytoplankton. *Marine Drugs*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/md17030151>

Jouhet, J. (2005). *ETUDE DES REMANIEMENTS LIPIDIQUES DES CELLULES VEGETALES EN CARENCE DE PHOSPHATE*. [Université Joseph-Fourier - Grenoble I]. <https://theses.hal.science/tel-00011166>

Jouhet, J. (2013). Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in Plant Science*, 4(DEC), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00494>

Jouhet, J., Lupette, J., Clerc, O., Magneschi, L., Bedhomme, M., Collin, S., Roy, S., Maréchal, E., & Rébeillé, F. (2017). LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: Consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. *PLoS ONE*, 13(10), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206397>

Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J., & Block, M. A. (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 167(5), 863–874. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407022>

Jouhet, J., Maréchal, E., Bligny, R., Joyard, J., & Block, M. A. (2003). Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Letters*, 544(1–3), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00477-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00477-0)

K

Kanduc, M., Schlaich, A., De Vries, A. H., Jouhet, J., Marechal, E., Deme, B., Netz, R. R., & Schneck, E. (2017). Tight cohesion between glycolipid membranes results from balanced water-headgroup interactions. *Communications*, 8, 14899. <https://doi.org/10.1038/ncomms14899>

Kang, H., Jia, C., Liu, N., Aboagla, A. A. A., Chen, W., Gong, W., Tang, S., & Hong, Y. (2020). Plastid glycerol-3-phosphate acyltransferase enhanced plant growth and prokaryotic glycerolipid synthesis in *Brassica napus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms21155325>

Karas, B. J., Diner, R. E., Lefebvre, S. C., McQuaid, J., Phillips, A. P. R., Noddings, C. M., Brunson, J. K., Valas, R. E., Deerinck, T. J., Jablanovic, J., Gillard, J. T. F., Beerli, K., Ellisman, M. H., Glass, J. I., Hutchison, C. A., Smith, H. O., Venter, J. C., Allen, A. E., Dupont, C. L., & Weyman, P. D. (2015). Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. *Nature Communications*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms7925>

Katayama, K., Sakurai, I., & Wada, H. (2004). Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene for cardiolipin synthase located in mitochondria. *FEBS Letters*, *577*(1–2), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.009>

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., & Dörmann, P. (2002). DGD2, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(2), 1166–1173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110066200>

Kelly, A. A., Froehlich, J. E., & Dörmann, P. (2003). Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes. *Plant Cell*, *15*(November), 2694–2706. <https://doi.org/10.1105/tpc.016675.amount>

Kobayashi, K., Awai, K., Nakamura, M., Nagatani, A., Masuda, T., & Ohta, H. (2009). Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant Journal*, *57*(2), 322–331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03692.x>

Kobayashi, K., Awai, K., Takamiya, K. I., & Ohta, H. (2004). *Arabidopsis* Type B Monogalactosyldiacylglycerol Synthase Genes Are Expressed during Pollen Tube Growth and Induced by Phosphate Starvation. *Plant Physiology*, *134*(2), 640–648. <https://doi.org/10.1104/pp.103.032656>

Koynova, R., & Tenchov, B. (2008). Lipids: Phase Transitions. In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1002/9780470048672.webc287>

Künzler, K., Eichenberger, W., & Adunzb, A. R. (1997). Intracellular Localization of Two Betaine Lipids by Cell Fractionation and Immunomicroscopy. In *Z. Naturforsch* (Vol. 52, Issue 9).

L

Li-Beisson, Y., Beisson, F., & Riekhof, W. (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, *82*(3), 504–522. <https://doi.org/10.1111/tpj.12787>

Li-Beisson, Y., Thelen, J. J., Fedosejevs, E., & Harwood, J. L. (2019). The lipid biochemistry of eukaryotic algae. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 74, pp. 31–68). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.003>

Li, M., Welti, R., & Wang, X. (2006). Quantitative profiling of Arabidopsis polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D ζ 1 and D ζ 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiology*, *142*(2), 750–761. <https://doi.org/10.1104/pp.106.085647>

Liu, J., Fu, S., Yang, L., Luan, M., Zhao, F., Luan, S., & Lan, W. (2016). Vacuolar SPX-MFS transporters are essential for phosphate adaptation in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *11*(8), e1213474. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1213474>

Liu, Y. C., Lin, Y. C., Kanehara, K., & Nakamura, Y. (2019). A methyltransferase trio essential for phosphatidylcholine biosynthesis and growth. *Plant Physiology*, *179*(2), 433–445. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01408>

Lu, N., Wei, D., Chen, F., & Yang, S. T. (2013). Lipidomic profiling reveals lipid regulation in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* in response to nitrate or phosphate deprivation. *Process Biochemistry*, *48*(4), 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.028>

Lu, Y., Eiriksson, F. F., Thorsteinsdóttir, M., Cronberg, N., & Simonsen, H. T. (2023). Lipidomes of Icelandic bryophytes and screening of high contents of polyunsaturated fatty acids by using lipidomics approach. *Phytochemistry*, *206*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113560>

Lupette, J., Jaussaud, A., Seddiki, K., Morabito, C., Brugière, S., Schaller, H., Kuntz, M., Putaux, J. L., Jouneau, P. H., Rébeillé, F., Falconet, D., Couté, Y., Jouhet, J., Tardif, M., Salvaing, J., & Maréchal, E. (2019). The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*, *38*(December 2018), 101415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101415>

Lynch, J. P., & Brown, K. M. (2001). Topsoil foraging - An architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil*, *237*(2), 225–237. <https://doi.org/10.1023/A:1013324727040>

M

Maheswari, U., Montsant, A., Goll, J., Krishnasamy, S., Rajyashri, K. R., Patell, V. M., & Bowler, C. (2005). The Diatom EST database. *Nucleic Acids Research*, *33*(DATABASE ISS.), 344–347. <https://doi.org/10.1093/nar/gki121>

Maréchal, E. (2024). *Plastids* (E. Maréchal (ed.)). Humana Press, New York, NY. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3726-5>

- Matos, A. R., & Pham-Thi, A. T. (2009). Lipid deacylating enzymes in plants: Old activities, new genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 491–503. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.02.011>
- Maulucci, G., Cohen, O., Daniel, B., Sansone, A., Petropoulou, P. I., Filou, S., Spyridonidis, A., Pani, G., De Spirito, M., Chatgililoglu, C., Ferreri, C., Kypreos, K. E., & Sasson, S. (2016). Fatty acid-related modulations of membrane fluidity in cells: detection and implications. *Free Radical Research*, 50(February 2019), S40–S50. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1231403>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659–668. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Meng, Y., Cao, X., Yang, M., Liu, J., Yao, C., & Xue, S. (2019). Glycerolipid remodeling triggered by phosphorous starvation and recovery in *Nannochloropsis oceanica*. *Algal Research*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101451>
- Mimura, T., Sakano, K., & Shimmen, T. (1996). Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant, Cell and Environment*, 19(3), 311–320. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00253.x>
- Misson, J. (2004). *Le signal phosphate chez "Arabidopsis thaliana" : analyse génétique et moléculaire* [Université d'Aix-Marseille I]. <http://www.theses.fr/2004AIX11060>
- Misson, J., Raghothama, K. G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M. A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., Dumas, P., Nacry, P., Herrerra-Estrella, L., Nussaume, L., & Thibaud, M. C. (2005). A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11934–11939. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505266102>
- Mühlroth, A., Winge, P., El Assimi, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Hohmann-Marriott, M. F., Vadstein, O., & Bones, A. M. (2017). Mechanisms of phosphorus acquisition and lipid class remodeling under P limitation in a marine microalga. *Plant Physiology*, 175(4), 1543–1559. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00621>
- Murakami, H., Nobusawa, T., Hori, K., Shimojima, M., & Ohta, H. (2018). Betaine lipid is crucial for adapting to low temperature and phosphate deficiency in *nannochloropsis*. *Plant Physiology*, 177(1), 181–193. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01573>

N

- Nakamura, Y. (2013). Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 52, Issue 1, pp. 43–50). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.07.002>
- Nakamura, Y. (2021). Headgroup biosynthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in seed plants. *Progress in Lipid Research*, 82(November 2020), 101091. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101091>
- Nakamura, Y., Awai, K., Masuda, T., Yoshioka, Y., Takamiya, K. I., & Ohta, H. (2005). A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7469–7476. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408799200>
- Nakamura, Y., Koizumi, R., Shui, G., Shimojima, M., Wenk, M. R., Ito, T., & Ohtad, H. (2009). Arabidopsis lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), 20978–20983. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907173106>
- Naumann, I., Klein, B. C., Bartel, S. J., Darsow, K. H., Buchholz, R., & Lange, H. A. (2011). Identification of sulfoquinovosyldiacylglycerides from *Phaeodactylum tricornutum* by matrix-assisted laser desorption/ionization QTrap time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 25(17), 2517–2523. <https://doi.org/10.1002/rcm.5137>
- Nelson, D. M., Tréguer, P., Brzezinski, M. A., Leynaert, A., & Quéguiner, B. (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles*, 9(3), 359–372. <https://doi.org/10.1029/95GB01070>
- Nishikawa, K., Machida, H., Yamakoshi, Y., Ohtomo, R., Saito, K., Saito, M., & Tominaga, N. (2006). Polyphosphate metabolism in an acidophilic alga *Chlamydomonas acidophila* KT-1 (Chlorophyta) under phosphate stress. *Plant Science*, 170(2), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.08.025>
- Noack, S. R., McLaughlin, M. J., Smernik, R. J., McBeath, T. M., & Armstrong, R. D. (2014). Phosphorus speciation in mature wheat and canola plants as affected by phosphorus supply. *Plant and Soil*, 378(1–2), 125–137. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-2015-3>
- Nussaume, L., & Kanno, S. (2024). Reviewing impacts of biotic and abiotic stresses on the regulation of phosphate homeostasis in plants. *Journal of Plant Research*, 137(3), 297–306. <https://doi.org/10.1007/s10265-024-01533-4>

O

- Oishi, Y., Otaki, R., Iijima, Y., Kumagai, E., Aoki, M., Tsuzuki, M., Fujiwara, S., & Sato, N. (2022). Diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine-dependent lipid remodeling in a green alga, *Chlorella kessleri*. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02927-z>
- Okazaki, Y., Otsuki, H., Narisawa, T., Kobayashi, M., Sawai, S., Kamide, Y., Kusano, M., Aoki, T., Hirai, M. Y., & Saito, K. (2013). A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2512>
- Oliver, M. J., Tuba, Z., & Mishler, B. D. (2000). The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. In *Plant Ecology* (Vol. 151).

P

- Pant, B. D., Burgos, A., Pant, P., Cuadros-Inostroza, A., Willmitzer, L., & Scheible, W. R. (2015). The transcription factor PHR1 regulates lipid remodeling and triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* during phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1907–1918. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru535>
- Parnell, J., & Foster, S. (2012). Ordovician ash geochemistry and the establishment of land plants. *Geochemical Transactions*, 13, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1467-4866-13-7>
- Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L. J., Bastien, O., Rébeillé, F., Jouhet, J., Falconet, D., Block, M. A., McFadden, G. I., Bowler, C., Botté, C., & Maréchal, E. (2014). Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways - From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research*, 54(1), 68–85. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.02.001>
- Poirier, Y., & Bucher, M. (2002). Phosphate Transport and Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, 1, e0024. <https://doi.org/10.1199/tab.0024>
- Poirier, Y., Thoma, S., Somerville, C., & Schiefelbein, J. (1991). A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiology*, 97(3), 1087–1093. <https://doi.org/10.1104/pp.97.3.1087>
- Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., & Pratt, S. (2009). Towards a luxury uptake process via microalgae - Defining the polyphosphate dynamics. *Water Research*, 43(17), 4207–4213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.011>

Puga, M. I., Rojas-Triana, M., de Lorenzo, L., Leyva, A., Rubio, V., & Paz-Ares, J. (2017). Novel signals in the regulation of Pi starvation responses in plants: facts and promises. *Current Opinion in Plant Biology*, 39(Figure 1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.007>

R

Raghothama, K. (1999). Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Biology*, 50(665–693). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.665>. PMID: 15012223

Raghothama, K. (2000). Phosphate transport and signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 182–187. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)80063-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)80063-1)

Raghothama, K., & Karthikeyan, A. S. (2005). Phosphate acquisition. *Plant and Soil*, 274(1–2), 37–49. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-2005-6>

Rainteau, D., Humbert, L., Delage, E., Vergnolle, C., Cantrel, C., Maubert, M. A., Lanfranchi, S., Maldiney, R., Collin, S., Wolf, C., Zachowski, A., & Ruelland, E. (2012). Acyl chains of phospholipase D transphosphatidylation products in Arabidopsis cells: A study using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041985>

Rao, N. N., Gómez-García, M. R., & Kornberg, A. (2009). Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 605–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.083007.093039>

Rausch, C., & Bucher, M. (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 216(1), 23–37. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0921-3>

Raven, J. A., & Knoll, A. H. (2010). Non-skeletal biomineralization by eukaryotes: Matters of moment and gravity. *Geomicrobiology Journal*, 27(6–7), 572–584. <https://doi.org/10.1080/01490451003702990>

Reitan, K., Rainuzzo, J., & Olsen, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol*, 30, 972–979. <https://doi.org/doi:10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x>

Remy, E., Cabrito, T. R., Batista, R. A., Teixeira, M. C., Sá-Correia, I., & Duque, P. (2012). The Pht1;9 and Pht1;8 transporters mediate inorganic phosphate acquisition by the Arabidopsis thaliana root during phosphorus starvation. *New Phytologist*, 195(2), 356–371. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04167.x>

- Reszczyńska, E., & Hanaka, A. (2020). Lipids Composition in Plant Membranes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 78(4), 401–414. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00947-w>
- Riekhof, W. R., Andre, C., & Benning, C. (2005). Two enzymes, BtaA and BtaB, are sufficient for betaine lipid biosynthesis in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 441(1), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.07.001>
- Riekhof, W. R., Naik, S., Bertrand, H., Benning, C., & Voelker, D. R. (2014). Phosphate starvation in fungi induces the replacement of phosphatidylcholine with the phosphorus-free betaine lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine. *Eukaryotic Cell*, 13(6), 749–757. <https://doi.org/10.1128/EC.00004-14>
- Riekhof, W. R., Ruckle, M. E., Lydic, T. A., Sears, B. B., & Benning, C. (2003). The Sulfolipids 2'-O-Acyl-Sulfoquinovosyldiacylglycerol and Sulfoquinovosyldiacylglycerol Are Absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* Mutant Deleted in SQD1. *Plant Physiology*, 133(2), 864–874. <https://doi.org/10.1104/pp.103.029249>
- Riekhof, W. R., Sears, B. B., & Benning, C. (2005). Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell*, 4(2), 242–252. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.242-252.2005>
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112. <https://doi.org/10.1002/bit.22033>
- Rozenstvet, O. A. (2004). Comparative examination of distribution of phospholipids and a betaine lipid DGTS in tropical fern species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(3), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.07.003>
- Rozenstvet, O. A., Saksonov, S. V., Filin, V. R., & Dembitsky, V. M. (2001). Seasonal changes of lipid content in the leaves of some ferns. *Physiologia Plantarum*, 113(1), 59–63. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130108.x>
- Ruiz, F. A., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govindjee, & Docampo, R. (2001). The Polyphosphate Bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* Possess a Proton-pumping Pyrophosphatase and Are Similar to Acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46196–46203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105268200>

S

- Sano, T., Kuraya, Y., Amino, S. I., & Nagata, T. (1999). Phosphate as a limiting factor for the cell division of tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology*, 40(1), 1–8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029464>
- Sapriel, G., Quinet, M., Heijde, M., Jourden, L., Tanty, V., Luo, G., Le Crom, S., & Lopez, P. J. (2009). Genome-wide transcriptome analyses of silicon metabolism in *Phaeodactylum tricornutum* reveal the multilevel regulation of silicic acid transporters. *PLoS ONE*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007458>
- Sato, N. (1991). Lipids in *Cryptomonas CR-1*. II. Biosynthesis of Betaine Lipids and Galactolipids. In *Plant Cell Physiol* (Vol. 32, Issue 6). <https://academic.oup.com/pcp/article-abstract/32/6/845/1818447>
- Sato, N. (1992). Betaine Lipids. *The Botanical Magazine, Tokyo*, 105, 185–197.
- Sato, N., & Furuya, M. (1985). Distribution of diacylglyceryltrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in non-vascular green plants. *Plant Science*, 38, 81–85.
- Scala, S., & Bowler, C. (2001). Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(11), 1666–1673. <https://doi.org/10.1007/PL00000804>
- Shanklin, J., & Somerville, C. (1991). Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2510–2514. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2510>
- Sheehan, J. D., Dunahay, T., Benemann, J. R., & Roessler, P. (2012). A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species. *The European Physical Journal C*, 72(6), 14. <http://www.springerlink.com/index/10.1140/epjc/s10052-012-2043-9%5Cnhttp://arxiv.org/abs/1203.5015>
- Sheikholeslam, S. N., & Weeks, D. P. (1987). Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 8(4), 291–298. <https://doi.org/10.1007/BF00021308>
- Shimajima, M., Madoka, Y., Fujiwara, R., Murakawa, M., Yoshitake, Y., Ikeda, K., Koizumi, R., Endo, K., Ozaki, K., & Ohta, H. (2015). An engineered lipid remodeling system using a galactolipid synthase promoter during phosphate starvation enhances oil accumulation in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00664>

- Singh, D., Nedbal, L., & Ebenhöf, O. (2018). Modelling phosphorus uptake in microalgae. *Biochemical Society Transactions*, 46(2), 483–490. <https://doi.org/10.1042/BST20170262>
- Smith, F. W. (2002). The phosphate uptake mechanism. *Plant and Soil*, 245(1), 105–114. <https://doi.org/10.1023/A:1020660023284>
- Smith, R., Jouhet, J., Gandini, C., Nekrasov, V., Marechal, E., Napier, J. A., & Sayanova, O. (2021). Plastidial acyl carrier protein $\Delta 9$ -desaturase modulates eicosapentaenoic acid biosynthesis and triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Journal*, 106(5), 1247–1259. <https://doi.org/10.1111/tpj.15231>
- Smith, S. E., Smith, F. A., & Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology*, 133(1), 16–20. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024380>
- Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100(1–3), 179–196. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00091-3)
- Solovchenko, A., Verschoor, A. M., Jablonowski, N. D., & Nedbal, L. (2016). Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. *Biotechnology Advances*, 34(5), 550–564. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.01.002>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Sun, L., Song, L., Zhang, Y., Zheng, Z., & Liu, D. (2016). Arabidopsis PHL2 and PHR1 act redundantly as the key components of the central regulatory system controlling transcriptional responses to phosphate starvation. *Plant Physiology*, 170(1), 499–514. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01336>
- Syers, J. K., Johnston, A. ., & Curtin, D. (2008). Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Vol. 9, Issue 6).

T

- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408.

Tixier-Vidal, A., Picart, R., Loudes, C., & Bauman, A. F. (1986). Effects of polyunsaturated fatty acids and hormones on synaptogenesis in serum-free medium cultures of mouse fetal hypothalamic cells. *Neuroscience*, *17*(1), 115–132. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90230-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90230-7)

To, A., Valon, C., Savino, G., Guilleminot, J., Devic, M., Giraudat, J., & Parcy, F. (2006). A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation. *Plant Cell*, *18*(7), 1642–1651. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039925>

Turmel, M. (1999). The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: Insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(18), 10248–10253. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10248>

U

Uwizeye, C., Decelle, J., Jouneau, P. H., Flori, S., Gallet, B., Keck, J. B., Bo, D. D., Moriscot, C., Seydoux, C., Chevalier, F., Schieber, N. L., Templin, R., Alloreant, G., Courtois, F., Curien, G., Schwab, Y., Schoehn, G., Zeeman, S. C., Falconet, D., & Finazzi, G. (2021). Morphological bases of phytoplankton energy management and physiological responses unveiled by 3D subcellular imaging. *Nature Communications*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21314-0>

V

Van Mooy, B. A. S., Fredricks, H. F., Pedler, B. E., Dyhrman, S. T., Karl, D. M., Koblížek, M., Lomas, M. W., Mincer, T. J., Moore, L. R., Moutin, T., Rappé, M. S., & Webb, E. A. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature*, *458*(7234), 69–72. <https://doi.org/10.1038/nature07659>

Vance, J. E., & Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research*, *44*(4), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.05.001>

Vogel, G., & Eichenberger, W. (1992). Betaine Lipids in Lower Plants. Biosynthesis of DGTS and DGTA in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) and the Possible Role of DGTS in Lipid Metabolism. In *Plant Cell Physiol* (Vol. 33, Issue 4).

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal*, *33*(5), 949–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x>

Vonlanthen, S., Dauvillée, D., & Purton, S. (2015). Evaluation of novel starch-deficient mutants of

Chlorella sorokiniana for hyper-accumulation of lipids. *Algal Research*, 12, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.008>

W

Wang, F., Deng, M., Xu, J., Zhu, X., & Mao, C. (2018). Molecular mechanisms of phosphate transport and signaling in higher plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 74, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.06.013>

Wang, Y., Wang, F., Lu, H., Liu, Y., & Mao, C. (2021). Phosphate Uptake and Transport in Plants: An Elaborate Regulatory System. *Plant and Cell Physiology*, 62(4), 564–572. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab011>

Wieczorek, D., Żyszka-Haberecht, B., Kafka, A., & Lipok, J. (2022). Determination of phosphorus compounds in plant tissues: from colourimetry to advanced instrumental analytical chemistry. *Plant Methods*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00854-6>

X

Xu, C., Moellering, E. R., Muthan, B., Fan, J., & Benning, C. (2010). Lipid transport mediated by arabidopsis TGD proteins is unidirectional from the endoplasmic reticulum to the plastid. *Plant and Cell Physiology*, 51(6), 1019–1028. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq053>

Y

Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., & Takriff, M. S. (2015). *Yaakob_2013_biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture.pdf*. 1–10.

Yang, S. Y., Huang, T. K., Kuo, H. F., & Chiou, T. J. (2017). Role of vacuoles in phosphorus storage and remobilization. *Journal of Experimental Botany*, 68(12), 3045–3055. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw481>

You, L., Połńska, A., Jasieniecka-Gazarkiewicz, K., Richard, F., Jouhet, J., Maréchal, E., Banaś, A., Hu, H., Pan, Y., Hao, X., Jin, H., Allen, A. E., Amato, A., & Gong, Y. (2024). Two plastidial lysophosphatidic acid acyltransferases differentially mediate the biosynthesis of membrane lipids and triacylglycerols in *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytologist*, 241(4), 1543–1558. <https://doi.org/10.1111/nph.19434>

Yu, B., Xu, C., & Benning, C. (2002). Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5732–5737. <https://doi.org/10.1073/pnas.08269649>

Z

- Zhang, S. F., Yuan, C. J., Chen, Y., Chen, X. H., Li, D. X., Liu, J. L., Lin, L., & Wang, D. Z. (2016). Comparative transcriptomic analysis reveals novel insights into the adaptive response of *Skeletonema costatum* to changing ambient phosphorus. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01476>
- Zhang, Z., Ma, X., Liu, Y., Yang, L., Shi, X., Wang, H., Diao, R., & Zhong, B. (2022). Origin and evolution of green plants in the light of key evolutionary events. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 64, Issue 2, pp. 516–535). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jipb.13224>
- Zhou, Y., Peisker, H., & Dörmann, P. (2016). Molecular species composition of plant cardiolipin determined by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 57(7), 1308–1321. <https://doi.org/10.1194/jlr.D068429>
- Zhu, S., Liang, C., Tian, J., & Xue, Y. (2022). Advances in Plant Lipid Metabolism Responses to Phosphate Scarcity. *Plants*, 11(17). <https://doi.org/10.3390/plants11172238>
- Zhu, W., Miao, Q., Sun, D., Yang, G., Wu, C., Huang, J., & Zheng, C. (2012). The mitochondrial phosphate transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 7(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043530>
- Zou, N., Zhang, C., Cohen, Z., & Richmond, A. (2000). Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (epa) in ultrahigh cell density cultures of *nannochloropsis* sp. (eustigmatophyceae). *European Journal of Phycology*, 35(2), 127–133. <https://doi.org/10.1080/09670260010001735711>
- Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., & Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research*, 70(March), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001>

Rôle des bétaine lipides dans l'adaptation à la carence en phosphate chez les algues et les plantes

Au cours de l'évolution, les organismes ont développé différentes stratégies afin de s'adapter aux stress rencontrés dans leur milieu. La disponibilité en nutriments représente une part importante de ces stress et peut conduire à des changements métaboliques conséquents. Le phosphore est un nutriment essentiel à la croissance des organismes ; il est assimilé sous la forme de phosphate inorganique (Pi) et se retrouve souvent limitant dans les écosystèmes. Chez les plantes, la carence en phosphate affecte grandement la croissance et génère un remodelage massif des lipides membranaires afin de remobiliser les réserves intracellulaires de Pi. Une part importante du Pi intracellulaire est stockée au niveau d'une classe particulière de glycérolipides appelée les phospholipides (PL), composants majoritaires des membranes extraplastidiales. En situation de carence, les PL sont dégradés afin de fournir à la cellule de nouvelles sources de Pi. Les PL dégradés sont alors remplacés par des lipides non phosphatés afin de maintenir la structure et l'intégrité des membranes. Cependant, ce remodelage lipidique est limité et ne permet de recycler qu'une partie des PL des membranes. Les mécanismes d'adaptation à la carence nutritionnelle sont également présents chez les microalgues ; un groupe très divers d'organismes unicellulaires photosynthétiques chez lesquels la réponse à la carence en Pi fait intervenir une autre classe de glycérolipides non phosphatés appelée bétaine lipides (BL). Les BL ont la capacité de remplacer l'intégralité des PL dégradés lors de la carence en Pi chez certaines espèces dont la microalgue *Phaeodactylum tricorutum* ; représentant ainsi un processus adaptatif particulièrement efficace. Au cours de l'évolution, la synthèse des BL a progressivement diminué jusqu'à être totalement perdue chez les plantes à graines, soulevant ainsi des interrogations quant à la raison de leur disparition. Ce projet de thèse s'intéresse à l'étude et à la comparaison du remodelage lipidique mis en place lors de la carence en Pi chez deux organismes photosynthétiques : les microalgues et les plantes terrestres.

Le premier axe a été de générer des plantes productrices de BL afin d'étudier l'impact de leur production sur leur phénotype et leur tolérance à la carence en Pi. Des transformations stables d'*Arabidopsis thaliana* ont été réalisées avec le gène *BTA1* codant l'enzyme responsable de la synthèse du DGTS ; l'espèce de BL la plus connue et étudiée. Pour cela, le gène *BTA1* de la microalgue *Microchloropsis gaditana* a été utilisé et a généré une faible production de DGTS chez les plantes transformées d'*A. thaliana*. Aucun impact majeur sur le phénotype n'a été observé mais lorsque l'enzyme est exprimée transitoirement dans les feuilles de la plante *Nicotiana benthamiana*, la production de DGTS est massive et représente environ 20 % des glycérolipides totaux. Chez ce modèle, le DGTS semble s'accumuler dans une prolifération de membranes du réticulum endoplasmique, suggérant qu'il remplit le même rôle structural que les PL. Le second axe de ce projet a été d'étudier l'impact de l'absence d'une autre espèce de BL, le DGTA, chez *P. tricorutum*. Des mutants knock-out pour le gène *BTA1* ont été générés et analysés. Les résultats ont apporté plusieurs éléments intéressants quant à la voie de synthèse du DGTA et à son importance dans la réponse de l'algue à la carence en Pi. Le DGTS, bien qu'il ne soit pas détecté chez *P. tricorutum*, intervient comme intermédiaire dans la synthèse du DGTA. Le DGTA s'est également révélé essentiel au maintien de la croissance de *P. tricorutum* en conditions de carence de Pi, ainsi que dans le processus de dégradation des PL sous cette condition. Des recherches supplémentaires sont à mener pour élargir l'étude des BL à d'autres organismes.

Mots clefs : métabolisme lipidique, carence en phosphate, bétaine lipides

Influence of betaine lipids in adaptation to phosphate deficiency in algae and plants

During evolution, organisms have developed different strategies to adapt to environmental stresses. Nutrient scarcity is a significant stress that can lead to substantial metabolic changes. Phosphorus is an essential nutrient for growth, it is assimilated as inorganic phosphate (Pi) and is often found to be limiting in ecosystems. In plants, phosphate deficiency greatly affects growth and induces massive membrane lipid remodeling to mobilize intracellular Pi reserves. A significant portion of intracellular Pi is stored in a particular class of glycerolipids called phospholipids (PL), which are the major components of extraplastidial membranes. Under deficiency conditions, PLs are degraded to provide new Pi sources to the cell. The degraded PLs are then replaced by non-phosphorus lipids to maintain membrane structure and integrity. However, this lipid remodeling is limited and only recycles a portion of the membrane PLs. Nutrient deficiency adaptation mechanisms are also present in microalgae, a highly diversified group of unicellular photosynthetic organisms. In these organisms, the response to Pi deficiency involves another class of non-phosphorus glycerolipids called betaine lipids (BL). BLs can completely replace the degraded PLs during Pi deficiency in certain species, such as the microalga *Phaeodactylum tricorutum*, representing a particularly efficient adaptive process. Throughout evolution, BL synthesis has gradually diminished and was definitively lost in seed plants, raising questions about the reasons for their disappearance. This project focuses on the study and comparison of lipid remodeling during Pi deficiency in two photosynthetic organisms: microalgae and terrestrial plants.

The first objective was to generate BL-producing plants to study the impact of their production on their phenotype and their tolerance to Pi deficiency. Stable transformations of *Arabidopsis thaliana* were performed with the *BTA1* gene encoding the enzyme responsible for DGTS synthesis, the best-known and studied BL species. The *BTA1* gene from the microalga *Microchloropsis gaditana* was used, resulting in low DGTS production in the transformed *A. thaliana* plants. No major phenotypic impact was observed, but when the enzyme was transiently expressed in the leaves of the plant *Nicotiana benthamiana*, DGTS production was massive, representing approximately 20% of total glycerolipids. In this model, DGTS appears to accumulate in a proliferation of endoplasmic reticulum membranes, suggesting that it fulfills the same structural role as PLs. The second objective of this project was to study the impact of the absence of another BL species, DGTA, in *P. tricorutum*. Knockout mutants for the *BTA1* gene were generated and analyzed. The results provided several interesting insights into the DGTA synthesis pathway and its importance in the algal response to Pi deficiency. Although DGTS is not detected in *P. tricorutum*, it acts as an intermediate in DGTA synthesis. DGTA was also found to be essential for maintaining the growth of *P. tricorutum* under Pi deficiency conditions and in the process of PLs degradation under this condition. Further research is needed to expand the study of BLs to other organisms.

Keywords: betaine lipids, phosphate deficiency, lipid metabolism

CEA Grenoble

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale
UMR 5138 CEA/CNRS/Université Grenoble-Alpes – UMR1417 INRAE
17 Avenue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 9

