



HAL
open science

Réponses de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* à une carence azotée suivie d'une resupplémentation : dynamique de formation et de dégradation des lipides neutres chez les écotypes Pt1 et Pt4

Victor Murison

► To cite this version:

Victor Murison. Réponses de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* à une carence azotée suivie d'une resupplémentation : dynamique de formation et de dégradation des lipides neutres chez les écotypes Pt1 et Pt4. Biochimie [q-bio.BM]. Le Mans Université, 2023. Français. NNT : 2023LEMA1021 . tel-04838658

HAL Id: tel-04838658

<https://theses.hal.science/tel-04838658v1>

Submitted on 15 Dec 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.

THESE DE DOCTORAT

DE
LE MANS UNIVERSITE
SOUS LE SCEAU DE
LA COMUE ANGERS – LE MANS

ECOLE DOCTORALE N° 642
Ecole doctorale Végétal, Animal, Aliment, Mer, Environnement
Spécialité : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Par
Victor MURISON

Réponses de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* à une carence azotée suivie d'une resupplémentation

Dynamique de formation et de dégradation des lipides neutres chez les écotypes Pt1 et Pt4

Thèse présentée et soutenue à Laval, le 13 décembre 2023
Unité de recherche : Biologie des Organismes, Stress, Santé, Environnement (BIOSSE)
Thèse N° : 2023LEMA1021

Rapporteurs avant soutenance :

Sabine D'ANDRÉA Professeure, AgroParisTech (Palaiseau)
Olivier GONCALVES Professeur, Nantes Université (Nantes)

Composition du Jury :

Président :	Claire HELLIO	Professeure, Université de Bretagne Occidentale (Brest)
Examineurs :	Sabine D'ANDRÉA	Professeure, AgroParisTech (Palaiseau)
	Olivier GONCALVES	Professeur, Nantes Université (Nantes)
	Yonghua LI-BEISSON	Directrice de recherche, CEA Cadarache (St Paul Lez Durance)
Dir. de thèse :	Lionel ULMANN	Professeur, Le Mans Université (Laval)
Co-encadr. :	Josiane HÉRAULT	Maître de Conférence, Le Mans Université (Laval)
	Justine MARCHAND	Maître de Conférence, Le Mans Université (Le Mans)

Tandis que notre planète, obéissant à la loi fixe de la gravitation, continue à tourner dans son orbite, une quantité infinie de belles et admirables formes, sorties d'un commencement si simple, n'ont pas cessé de se développer et se développent encore !

Charles Darwin, *L'Origine des espèces*

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je tiens à remercier les membres du jury de consacrer du temps à examiner mon travail. Merci à Sabine d'Andréa et à Olivier Gonçalves d'avoir endossé la fonction de rapporteurs ainsi qu'à Claire Hellio et Yonghua Li-Beisson d'avoir accepté d'être examinatrices. Je vous remercie tout particulièrement Sabine, nos routes se croisent à nouveau par le hasard des thématiques de recherche et je suis heureux que vous puissiez voir ma progression depuis mon passage à AgroParisTech. J'adresse également un remerciement particulier à Yonghua pour avoir participé aux comités de suivi individuel de ma thèse.

Je souhaite adresser un remerciement spécial à Gaël Bougaran, qui a également participé aux comités de suivi individuel de ma thèse et, par ses suggestions, nous a mis sur la voie de l'étude de la resupplémentation et des voies de dégradation des lipides. Merci également pour l'accès à l'IFREMER de Nantes.

Ce travail de thèse a pu se dérouler dans les meilleures conditions grâce à la disponibilité de mon directeur de thèse Lionel Ulmann. Merci du temps passé à écouter et comprendre mes raisonnements alambiqués et mes idées saugrenues, tu m'as aidé à me cadrer. Je remercie également mes deux co-encadrantes Josiane Hérault et Justine Marchand. Merci Josy pour ta présence et les discussions lors de tes passages au Cérium. Malgré la distance entre Le Mans et Laval, merci à toi Justine d'avoir toujours été prompte à répondre à mes interrogations et à améliorer mes écrits.

Mes remerciements vont aussi aux équipes de Rouen qui m'ont accueillies en mai 2022. Merci à Muriel Bardor et Ludovic Galas pour la collaboration que nous avons conduite de bout en bout. Merci à Carole Burel de m'avoir accompagné et guidé dans le labyrinthe de GlycoMEV. Merci à Magalie Bénard, Christophe Chamot, Damien Schapman et Alexis Lebon de m'avoir instruit aux arcanes de la microscopie et du traitement d'images !

Je remercie également les collègues qui ont apporté leur pierre à l'édifice de mes travaux. Merci à toi Sabrina de m'avoir secondé pendant ton stage de M2, j'espère que tu gardes avec toi les quelques trucs que tu y as appris ! Merci à Benoît Schoefs, Gaëlle Pencreac'h, Céline Loiseau et Anthony Kwasiborski pour les suggestions pertinentes et l'aide apportée au démarrage des manip de traitement pharmacologique et de qPCR. Merci à toi Martine, sans qui le labo ne serait pas le labo. Les discussions à la paillasse ont permis d'alléger les jours où l'on « fait et défait ». Merci à Florence pour nos conversations, au labo en tentant de développer cette fichue méthode HPLC, et en-dehors autour d'un verre. Un grand merci à mon compère de galère pour cette dernière année, Jordi, escaladeur patenté et grand amateur de pintes de Fisher ambrée. Merci

aussi à la team du journal club et collègues : Valériane, Nail, Mamoudou, Sebastian, Bérénice, Hamza et Vincent. Bon courage pour la suite, et la fin de thèse pour certains !

Merci à tous les personnels de l'IUT qui font tourner la barraque. Fred, Rose-Marie et Isabelle au labo, François pour les déblocages informatiques et notre moun à tout faire, Jean-Luc, qui a en plus ramené un peu de la Rényon dan mon kèr.

Je souhaite mentionner les musiciens qui ont fourni la bande-son de cette thèse, et ont ainsi accompagné mes longues journées au labo. Merci à La Femme, Pomme, Bigflo et Oli, Fauve, Manu Chao, Nujabes, Yoko Kano, Thérapie Taxi et Alan Stivell.

Je tiens à remercier la familia des Agros au sens large : Myriam, Camille, Tristan, Anna, Aurélie, Marie, Chloé F., Chloé C., Yohann, Arthur, Grégoire, Louise, Paul, Estelle, Camille, Juliette, Aurélien, Caroline, Christophe. Pour tous les bons moments passés pendant ces trois années et les précédentes. C'était un bol d'air frais de pouvoir avoir la tête dans autre chose que les lipides de diatomées (même si ça tourne souvent autour de la thèse de l'un ou l'autre !).

Je remercie ma famille, et mesure la chance que j'ai de vous avoir, même si je ne suis pas toujours très fort pour donner des nouvelles. Je remercie mes parents pour leur soutien depuis aussi loin que je me souviens, bien qu'ils aient eu un regard un peu dubitatif vis-à-vis de mes études de biologie, qui plus est suivies d'une thèse ! Merci à Tito et Philippe et leurs familles désormais bien remplies. Merci à Uncle Bibi et Tati Véro, Tati Caco et parrain Bob, Christine et Christian de m'avoir, chacun à sa manière, accompagné au long du chemin. Merci aux cousins pour tous ces bons moments passés et à venir, à Pastrana ou ailleurs. Et merci aux Yayos et à Jimmy et Gilberte d'avoir permis tout ça. Merci à ma belle-famille d'avoir ajouté le soutien d'une deuxième famille à la première. Nos conversations sont parfois un peu difficiles pour l'introverti que je suis, mais toujours enrichissantes et le temps passé ensemble est fait de vrais moments de qualité.

Merci ma Fanny pour nos 10 ans d'histoire et beaucoup d'autres à venir encore, pour ton soutien sans faille dans les projets que j'entreprends. Dans le bonheur et dans les épreuves comme on dit... Samovar !

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIÈRES	6
TABLE DES FIGURES	11
TABLE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES ABRÉVIATIONS	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	15
I – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1 – La diatomée modèle <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	22
1.1 – Caractéristiques des algues	22
1.1.1 – Définition générale	22
1.1.2 – Des histoires évolutives complexes par endosymbioses.....	23
1.2 – Caractéristiques des diatomées.....	25
1.2.1 – Les straménopiles	25
1.2.2 – La classification des diatomées.....	25
1.2.3 – L’organisation interne des diatomées	27
1.2.4 – Aspects écologiques et place dans la bioéconomie.....	29
1.2.5 – Les particularités du génome des diatomées et l’émergence d’espèces modèle	30
1.3 – <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	31
1.3.1 – Les écotypes de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> et sa pléomorphie.....	31
1.3.2 – Une espèce modèle pour la génétique.....	33
1.3.3 – Les lipides présents chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	34
1.3.3.1 – Les acides gras	35
1.3.3.2 – Les lipides neutres.....	36
1.3.3.3 – Les lipides polaires	38
1.3.3.4 – Les autres lipides.....	40
2 – Le métabolisme des lipides des diatomées	41
2.1 – De l’assimilation du carbone à la formation des lipides	41
2.1.1 – L’import du carbone inorganique et sa concentration dans la cellule	41
2.1.2 – La photosynthèse.....	43

2.1.3 – Le devenir du glycéraldéhyde-3-phosphate.....	46
2.2 – La synthèse des lipides	47
2.2.1 – La synthèse des acides gras saturés	47
2.2.2 – La synthèse des acides gras insaturés.....	48
2.2.3 – La synthèse des glycérolipides	52
2.2.3.1 – La voie de Kennedy	52
2.2.3.2 – La synthèse des lipides polaires	53
2.2.3.3 – La synthèse des triglycérides.....	55
2.3 – Le dégradation des lipides	58
2.3.1 – Les lipases et la lipolyse	58
2.3.1.1 – Caractéristiques générales	58
2.3.1.2 – Les lipases identifiées chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	59
2.3.1.3 – Localisation et mécanismes de la lipolyse	60
2.3.2 – L'autophagie des gouttelettes lipidiques ou lipophagie	63
2.3.3 – La bêta-oxydation des acides gras.....	64
3 – Stress et formation de gouttelettes lipidiques	70
3.1 – Les effets du stress azoté sur le métabolisme de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	70
3.1.1 – Effets biochimiques et physiologiques.....	70
3.1.2 – Effets métaboliques.....	71
3.1.2.1 – Modifications de la capture, de l'assimilation et du métabolisme de l'azote	71
3.1.2.2 – Modifications de la photosynthèse.....	73
3.1.2.3 – Modifications de l'orientation du carbone	74
3.1.2.4 – Modifications du métabolisme des lipides	76
3.2 – Caractéristiques biochimiques des gouttelettes lipidiques	80
3.2.1 – Composition en lipides et pigments.....	80
3.2.2 – Composition en protéines.....	81
3.2.2.1 – Les protéines majeures de gouttelettes lipidiques.....	82
3.2.2.2 – Les protéomes de gouttelettes lipidiques	83
3.3 – La formation des gouttelettes lipidiques	87

3.3.1 – Mécanismes généraux de formation	88
3.3.2 – L'adressage des protéines chez les diatomées	89
3.3.2.1 – Les séquences signal	90
3.3.2.2 – Le transport des protéines vers le réticulum endoplasmique ou le plaste 90	
3.3.2.3 – L'association des protéines avec les gouttelettes lipidiques	92
3.3.3 – La formation de populations de gouttelettes lipidiques	93
3.3.3.1 – La dynamique de formation	93
3.3.3.2 – L'origine des lipides présents dans les gouttelettes	95
OBJECTIFS DE CE TRAVAIL.....	97
II – MATÉRIEL & MÉTHODES	101
1 – Matériel biologique et méthodes de culture	102
1.1 – Souches de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	102
1.2 – Dispositifs et milieux de culture.....	102
1.3 – Mise en œuvre des expériences de carence azotée et de resupplémentation nutritive	103
1.4 – Suivis de culture	104
1.5 – Caractérisation de la photosynthèse des souches	105
2 – Analyses biochimiques.....	106
2.1 – Détermination des quotas intracellulaires en carbone et en azote	106
2.2 – Extraction et dosage des pigments.....	106
2.3 – Extraction et dosage des protéines et glucides solubles	107
2.4 – Étude des lipides	108
2.4.1 – Extraction des lipides totaux.....	108
2.4.2 – Séparation des classes de lipides	109
2.4.3 – Séparation des lipides par chromatographie sur couche mince.....	109
2.4.4 – Détermination des profils en acides gras et quantification.....	110
2.4.5 – Dosage spectrophotométrique des lipides.....	111
3 – Méthodes de Microscopie	111
3.1 – Microscopie confocale	111
3.1.1 – Marquage avec le BODIPY 505/515	112

3.1.2 – Acquisition par microscopie confocale.....	112
3.1.3 – Modélisation 3D avec IMARIS.....	112
3.2 – Microscopie en transmission (Cell Discoverer 7)	113
3.2.1 – Acquisition.....	113
3.2.2 – Traitement des images.....	114
4 – Analyses bioinformatiques	115
4.1 – Récupération et vérification des séquences.....	115
4.2 – Prédiction de caractéristiques des protéines candidates.....	115
4.3 – Prédiction de la structure tertiaire des protéines candidates	116
5 – Méthodes de biologie moléculaire	116
5.1 – Extraction des ARN totaux.....	116
5.2 – La transcription inverse.....	117
5.3 – PCR quantitative.....	118
5.3.1 – Conception des amorces	118
5.3.2 – Test d’efficacité des amorces	120
5.3.3 – Sélection des gènes de ménage	121
5.3.4 – Calcul de l’expression relative des gènes testés	122
6 – Traitement de culture par des inhibiteurs de la dégradation des lipides.....	122
6.1 – Inhibiteurs de la dégradation des lipides.....	122
6.2 – Expériences de culture en microplaques 12 puits.....	123
6.3 – Expériences de resupplémentation avec les inhibiteurs de lipases.....	123
7 – Analyses statistiques et visualisation des données	124
III – RÉSULTATS	125
1 – La comparaison de deux écotypes de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> soumis à une carence en azote et une resupplémentation révèle des stratégies d’accumulation de lipides distinctes mais un processus de dégradation similaire	126
1.1 – Contexte et principaux résultats.....	127
1.2 – Article 1	129
1.3 – Matériel supplémentaire	147
2 – Approche de criblage utilisant les données bioinformatiques pour l’identification et la caractérisation d’enzymes lipolytiques de la diatomée marine <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	153

2.1 – Contexte et principaux résultats.....	154
2.2 – Article 2	155
2.3 – Matériel supplémentaire	175
3 – Voies métaboliques des lipides neutres et de la chrysolaminarine pendant une carence en azote suivie d'une récupération cellulaire chez la diatomée <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	176
3.1 – Contexte et principaux résultats.....	177
3.2 – Article 3	178
3.3 – Matériel supplémentaire	202
4 – Approche de traitement pharmacologique par deux inhibiteurs de la dégradation des lipides	206
4.1 – Contexte et conception de l'expérience	207
4.2 – Détermination de la dose non-toxique	208
4.3 – Traitements pendant une carence suivie d'une resupplémentation.....	210
4.3.1 – Effets de la chloroquine.....	210
4.3.2 – Effets de l'ATGlistatine	212
4.4 – Discussion et améliorations possibles	214
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	215
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	221
Liste des publications et communications.....	250

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : L'arbre des eucaryotes	22
Figure 2 : L'enchaînement des endosymbioses primaires et secondaires dans l'évolution des organismes photosynthétiques.....	24
Figure 3 : Morphologie du frustule des diatomées	26
Figure 4 : Exemple d'arrangement de diatomées sur une lame de microscope présentant un échantillon de leur diversité morphologique	27
Figure 5 : Schéma de l'organisation interne d'une diatomée pennée	27
Figure 6 : Quelques exemples d'applications industrielles des diatomées	30
Figure 7 : Micrographie obtenues au microscopie confocal montrant la variété de morphologies possibles chez <i>P. tricornutum</i>	32
Figure 8 : Lieux d'isolation et groupes génotypiques des différents écotypes de <i>P. tricornutum</i> dont le génome a été séquencé.	33
Figure 9 : Le glycérol et les principales classes de lipides neutres.....	37
Figure 10 : Les principaux phospholipides trouvés chez <i>P. tricornutum</i>	38
Figure 11 : Les principaux glycolipides trouvés chez <i>P. tricornutum</i>	39
Figure 12 : Les principaux bétaïne lipides trouvés chez <i>P. tricornutum</i>	40
Figure 13 : Les deux types de mécanismes de concentration du carbone présents chez les diatomées	42
Figure 14 : La chaîne de transfert d'électrons des diatomées	44
Figure 15 : La phase sombre de la photosynthèse et les mécanismes de régulation du pouvoir réducteur en excès	45
Figure 16 : Les étapes de la synthèse des acides gras chez les diatomées	47
Figure 17 : Le devenir des acides gras incluant transports, élongations et désaturations	49
Figure 18 : La synthèse des DG par la voie de Kennedy	52
Figure 21 : Le repliement α/β des lipases montrant les positions des résidus catalytiques et du pentapeptide conservé	58
Figure 22 : Les sites d'action des différents types de phospholipases	59
Figure 23 : Schéma simplifié des mécanismes de la lipolyse dans les adipocytes de mammifères et les cellules de graines oléagineuses.....	61
Figure 24 : Le cycle de Lands et les redistributions des chaînes acyl associées par le recyclage	62
Figure 25 : Schéma des différents types de lipophagie présents chez les eucaryotes	63
Figure 26 : La navette carnitine permettant le transfert des acyl-CoA à travers la membrane de la mitochondrie	65
Figure 27 : Les voies de la β -oxydation des acides gras chez les diatomées	66
Figure 28 : Les réorientations de la capture, de l'assimilation et du métabolisme de l'azote chez <i>P. tricornutum</i> pendant une carence azotée	72
Figure 29 : Les réorientations de la photosynthèse chez <i>P. tricornutum</i> pendant une carence azotée	73

Figure 30 : Les réorientations du métabolisme central du carbone chez <i>P. tricornutum</i> pendant une carence azotée	75
Figure 31 : Les réorientations du métabolisme des lipides chez <i>P. tricornutum</i> pendant une carence azotée	77
Figure 32 : Récapitulatif des principaux effets d'un stress azoté sur une cellule de <i>P. tricornutum</i>	79
Figure 33 : Schéma d'une gouttelette lipidique de <i>P. tricornutum</i>	80
Figure 34 : Représentation schématique de l'association des deux classes de protéines avec les LD81	
Figure 35 : Récapitulatif des différentes fonctions trouvées dans les protéomes de gouttelettes lipidiques de <i>P. tricornutum</i>	84
Figure 36 : Deux hypothèses pour la synthèse des gouttelettes lipidiques chez <i>P. tricornutum</i>	87
Figure 37 : Le mécanisme général de formation des gouttelettes lipidiques dans la cellule	88
Figure 38 : Topologie du signal d'adressage bipartite des protéines plastidiales de diatomées	90
Figure 39 : Les différents systèmes d'imports de protéines dans le plaste des diatomées	91
Figure 40 : Différentes stratégies d'accumulation de gouttelettes lipidiques au cours d'une carence en azote chez différentes souches de <i>P. tricornutum</i>	95
Figure 41 : Micrographies obtenues en microscopie confocale des écotypes Pt1 et Pt4.....	102
Figure 42 : Exemple de courbe photosynthèse-irradiance obtenue pour l'écotype Pt1.....	105
Figure 43 : Exemple de spectre d'absorption d'un extrait de pigments totaux de <i>P. tricornutum</i> Pt1 .	107
Figure 44 : Étapes d'extraction et d'analyse des lipides de <i>P. tricornutum</i>	108
Figure 45 : Courbe d'étalonnage du dosage des lipides selon la méthode de Marsh et Weinstein	111
Figure 46 : Démarche mise en œuvre pour les mesures de microscopie confocale	113
Figure 47 : Exemples de courbes établies pour déterminer l'efficacité des amorces	120
Figure 48 : Résultats du calcul de l'indice RefFinder quantifiant la stabilité des gènes de ménage ..	121
Figure 49 : Chronogramme des différentes conditions de traitement	208
Figure 50 : Effets d'une gamme de concentrations de chloroquine et d'ATGlistatine.....	209
Figure 51 : Évolution des paramètres biochimiques dans les expériences de traitement par la chloroquine	211
Figure 52 : Évolution des paramètres biochimiques dans les expériences de traitements par l'ATGlistatine.....	213

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Les principaux acides gras trouvés chez <i>P. tricornutum</i>	36
Tableau II : Récapitulatif des principales propriétés des synthétases d'acyl-CoA à longue chaîne.....	50
Tableau III : Récapitulatif des études de génomique fonctionnelle menées sur les enzymes impliquées dans les voies de production et de dégradation des glycérolipides chez <i>P. tricornutum</i>	67
Tableau IV : Composition du milieu de culture f/2 utilisé	103
Tableau V : Conversions pour calculer les quantités de complément à ajouter au milieu	104
Tableau VI : Couples d'amorces utilisés pour la qPCR.....	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC : Anhydrase Carbonique
ACCCase : Acétyl-CoA Carboxylase
ACL : Acyl-CoA Ligase
ACP : *Acyl-CoA Binding Protein* (Protéine de Liaison aux Acyl-CoA)
ACAD : Acyl-CoA Déshydrogénase
ACOX : Acyl-CoA Oxydase
ATGL : *Adipose Triglyceride Lipase*
ATG : *Autophagy related protein* (Protéine associée à l'autophagie)
AGL : Acides Gras Libres
ALA : Acide α -Linoléique
AOA : Acide Oxaloacétique
ARA : Acide Arachidonique
BCAA : *Branched-Chain Amino Acids* (Acides Aminés à Chaîne Ramifiée)
BL : Bétaïne Lipide
cERM : *chloroplastic Endoplasmic Reticulum* (Réticulum endoplasmique chloroplastique)
CCM : *Carbon Concentration Mechanisms* (Mécanismes de Concentration du Carbone)
CDP : Cytidine Diphosphate
CPT : Carnitine Palmitoyl Transférase
CGI-58 : *Comparative Gene Identification 58*
CoA : Co-enzyme A
COU : Cycle Ornithine Urée
DG : Diacylglycérol, Diglycéride
DGAT : Diacylglycérol Acyltransférase
DGD : Digalactosyl Diacylglycérol Synthase
DGDG : Digalactosyl Diacylglycérol
DGTA : Diacylglycérol Hydroxyméthyltriméthyl- β -alanine
DGTS : Diacylglycérol Triméthylhomosérine
DHA : *Docosahexaenoic Acid* (Acide Docosahexaénoïque)
DIC : *Dissolved Inorganic Carbon* (Carbone Inorganique Dissous)
ECH : Énoyl-CoA Hydratase
EPA : *Eicosapentaenoic Acid* (Acide Eicosapentaénoïque)
FAO : *Fatty Acid Oxidation complex* (complexe d'Oxydation des Acides Gras)
FAS : *Fatty Acid Synthase* (Acide Gras Synthase)
FAX : *Fatty Acid Export* (Exporteur d'acide gras)
FCP : *Fucoxanthin/Chlorophyll binding Protein*
GA3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate
GDH : Glutamate Déshydrogénase
GFP : *Green Fluorescent Protein*
GL : Glycolipide
GLA : Acide γ -Linoléique
GPAT : Glycérol-3-Phosphate Acyltransférase
GS-GOGAT : Glutamine Synthase-Glutamine:2-Oxoglutarate Aminotransférase
G3P : Glycérol-3-Phosphate
HADH : Hydroxy-Acyl-CoA-Déshydrogénase
HSL : *Hormone Sensitive Lipase*
Hsp70 : *Heat Shock Protein 70*
KCT : *Ketoacyl-CoA Thiolase* (Cétoacyl-CoA Thiolase)
KD : *Knockdown*
KO : *Knock-Out*
iEM : *inner Enveloppe Membrane* (Membrane interne de l'Enveloppe plastidiale)
LACS : *Long-Chain Acyl-CoA Synthetase* (Synthétase d'Acyl-CoA à Longue Chaîne)
LD : *Lipid Droplets* (Gouttelettes Lipidiques)
LHC : *Light Harvesting Complex* (Antenne Collectrice de photosystème)
LN : Lipide Neutre
LP : Lipide Polaire
LPA : *Lysophosphatidic Acid* (Acide Lysophosphatidique)
LPAAT : *Lysophosphatidic Acid Acyltransferase* (Acide Lysophosphatidique Acyltransférase)

LPC : Lysophosphatidylcholine
 LPCAT : Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholine Acyltransférase
 MCAT : Malonyl-CoA:ACP Transacylase
 MCS : *Membrane Contact Sites* (Sites de Contact Membranaire)
 MDH : Malate Déshydrogénase
 ME : *Malic Enzyme* (Enzyme Malique)
 MG : Monoacylglycérol
 MGD : Monogalactosyl Diacylglycérol Synthase
 MGDG : Monogalactosyl Diacylglycérol
 MGL : Monoacylglycérol Lipase
 MUFA : *Monounsaturated Fatty Acid* (Acide Gras Monoinsaturé)
 NR : Nitrate Réductase
 OE : *Overexpression* (Sur-expression)
 oEM : *outer Enveloppe Membrane* (Membrane externe de l'Enveloppe plastidiale)
 PA : *Phosphatidic Acid* (Acide Phosphatidique)
 PAP : *Phosphatidic Acid Phosphatase*
 PC : Phosphatidylcholine
 PDAT : Phospholipide:Diacylglycérol Acyltransférase
 PDC : *Pyruvate Dehydrogenase Complex* (Complexe Pyruvate Déshydrogénase)
 PE : Phosphatidyléthanolamine
 PEP : Phosphoénolpyruvate
 PG : Phosphatidylglycérol
 PI : Phosphatidylinositol
 PL : Phospholipide
 PLA2 : Phospholipase A2
 PLC : Phospholipase C
 PLD : Phospholipase D
 PLIN1a : Périlipine 1a
 PNPLA3 : *Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing 3*
 PPC : *Periplastidial Compartment* (Compartiment Périplastidial)
 PPM : *Periplastidial Membrane* (Membrane Périplastidiale)
 PS : Phosphatidylsérine
 PSI : Photosystème I
 PSII : Photosystème II
 PtLDP1 : *Phaeodactylum tricornutum Lipid Droplet Protein 1*
 PUFA : *Polyunsaturated Fatty Acid* (Acide Gras Polyinsaturé)
 RE : Réticulum Endoplasmique
 ROS : *Reactive Oxygen Species* (Espèces Réactives de l'Oxygène)
 RubisCO : Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase Oxygénase
 S-AdoMet : S-Adénosylméthionine
 SDP-1 : *Sugar-Dependant Lipase 1*
 SFA : *Saturated Fatty Acid* (Acide Gras Saturé)
 sn : *stereospecific number* (nombre stéréospécifique)
 SNARE : *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*
 SQDG : Sulfoquinovosyl Diacylglycérol
 StLDP : *Stramenopile Lipid Droplet Protein*
 TIC : *Translocon on the Inner Chloroplast membrane* (Translocon sur la membrane interne du Chloroplaste)
 TOC : *Translocon on the Outer Chloroplast membrane* (Translocon sur la membrane externe du Chloroplaste)
 TG : Triacylglycérol, Triglycéride
 wt : *wild-type* (Souche sauvage)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au cours des dernières années, les microalgues ont fait l'objet d'un intérêt croissant en tant que ressource renouvelable alternative aux plantes terrestres dans de nombreux domaines, y compris pour remplacer les ressources fossiles. Les microalgues ont en effet de nombreux avantages : elles ont une photosynthèse plus efficace que celle des plantes terrestres, peuvent être cultivées sans utiliser de sols agricoles et n'entrent donc pas en compétition avec la production alimentaire « standard ». Certaines peuvent croître dans de l'eau salée ou dans des eaux usées dont elles peuvent même épurer l'azote et le phosphore (Borowitzka, 2013; Rafa et al., 2021; Sun et al., 2023). En outre, la composition des microalgues est très intéressante pour la nutrition humaine et animale, voire la cosmétique, car elles sont particulièrement riches en protéines, en acides gras oméga 3 et en antioxydants (Chew et al., 2017). Certaines microalgues très riches en lipides et/ou en glucides sont régulièrement envisagées comme biomasse source pour la production de biocarburants, respectivement de biodiésel et de bioéthanol (Borowitzka, 2013; Chew et al., 2017; Rafa et al., 2021; Sun et al., 2023). Pourtant, parmi les dizaines de milliers d'espèces qui composent ce groupe, un peu plus d'une dizaine seulement est exploitée commercialement (Borowitzka, 2018).

Ce vaste gisement d'espèces inexploitées est une importante ressource mobilisable dans le contexte actuel de crise environnementale. Le phytoplancton, constitué de microalgues, est un important contributeur à la pompe biologique du carbone dans l'océan (Guidi et al., 2016). Il est estimé qu'il représente environ 50% de la photosynthèse nette globale (Field et al., 1998). Ainsi, les microalgues ont été envisagées comme l'un des moyens d'atténuer le changement climatique en capturant et immobilisant du CO₂ dans leur biomasse, par exemple en captant les fumées (*flue gas*) en sortie de cimenterie ou de centrales thermiques (Thomas et al., 2016; Joun et al., 2023).

En effet, la combustion des ressources fossiles augmente la concentration en CO₂ dans l'atmosphère car ce faisant, le carbone contenu dans ces ressources entre à nouveau dans le cycle du carbone qu'il avait quitté plusieurs millions d'années auparavant. La combustion de carburants à base de microalgues n'ajoute dans l'atmosphère que du CO₂ qui y était présent au moment où les microalgues ont été produites et ne contribue pas à une augmentation nette (Maréchal, 2021). La prise en compte de toutes les étapes de la production de ces combustibles renouvelables peut augmenter le bilan carbone du processus global, tout en restant moins impactant que l'utilisation de pétrole (Kim et al., 2022). Cependant, le principal obstacle à l'utilisation des microalgues comme carburant reste un coût de production supérieur à celui des ressources fossiles (Branco-Vieira et al., 2020; Rafa et al., 2021). Au niveau de développement actuel, ce coût est entre 2 et 4 fois plus élevé que le coût de production de diésel pétrolier (Kim et al., 2022). En effet, les coûts de l'exploitation des microalgues peuvent être élevés notamment pour la récolte, la concentration et le séchage de la biomasse et

éventuellement l'extraction des molécules d'intérêt (Borowitzka, 2013; Rafa et al., 2021; Kim et al., 2022). Malgré cet obstacle, la culture de microalgues pour la production de biodiésel reste intéressante à développer pour répondre à plusieurs enjeux : le remplacement des ressources fossiles, le maintien des terres agricoles (les carburants à base de microalgues consommeraient 90% d'espace en moins par rapport aux cultures de plantes oléagineuses), et l'eutrophisation des eaux de surface (Kim et al., 2022).

La poursuite de l'effort de recherche et développement est d'autant plus nécessaire que de nombreux aspects de la culture, de la récolte et de l'extraction des molécules d'intérêt n'ont pas encore été optimisés pour ces biomasses. Outre l'optimisation des procédés, plusieurs pistes non mutuellement exclusives ont été avancées pour réduire les coûts et permettre une exploitation rentable : 1 – coupler plusieurs activités, comme dans des systèmes où les microalgues servent à l'épuration de l'eau puis sont récoltées pour en extraire des molécules d'intérêt (Rafa et al., 2021) ; 2 – augmenter la concentration en biomasse produite (en sélectionnant par exemple les souches les plus productives) ; 3 – augmenter le contenu en molécules d'intérêt dans la biomasse (par exemple le contenu en lipides).

Ce dernier aspect a fait l'objet de nombreux travaux. L'un des leviers majeurs pour faire varier la composition de la biomasse est d'altérer les conditions de culture des microalgues. Cette altération peut provoquer des stress, dont l'un des marqueurs principaux chez les microalgues est une production accrue de lipides. Des modifications de la teneur en lipides et/ou de la composition en acides gras des lipides dans les microalgues ont été montrées pour de nombreux facteurs de stress comme des changements dans la quantité (Guihéneuf et al., 2009, 2015) et la qualité de la lumière (Duarte et al., 2021; Fierli et al., 2023), de température (Wu et al., 2013) ou de pH (Qiu et al., 2017), avec la présence de H₂O₂ (Burch and Franz, 2016), de NO (Dolch et al., 2017a), ou de phytohormones (Chu et al., 2019; Zhang et al., 2021a; Fierli et al., 2023), ou encore avec la présence d'une source de carbone inorganique (bicarbonate) (Mus et al., 2013; Nunez and Quigg, 2016) ou organique (acétate) (Guihéneuf et al., 2009; Kaur et al., 2021) voire une concentration en CO₂ élevée (Jensen et al., 2019). La méthode la plus commune pour induire une forte augmentation de lipides neutres chez les microalgues est l'application d'une limitation ou d'une carence en azote ou en phosphore (voir par exemple Abida et al., 2015), des éléments fréquemment limitants dans les océans (Moore et al., 2013). Le problème majeur de cette méthode pour les productions commerciales a été remarqué dès le rapport de conclusion de l'*Aquatic Species Programme*, un projet de recherche américain conduit de 1980 à 1996 portant sur l'utilisation de microalgues pour la production de biocarburants (Sheehan et al., 1998) : « Il est possible que l'observation la plus significative [de ce projet] soit que les conditions qui favorisent une forte productivité et une croissance rapide (présence de nutriments) et les conditions qui induisent une accumulation

de lipides (limitation en nutriments) sont mutuellement exclusives¹ ». Pour renverser cette barrière, le rapport suggère de s'orienter vers l'amélioration génétique, permettant d'augmenter le niveau de lipides constitutif des microalgues.

Pour pouvoir l'améliorer, il est nécessaire de bien connaître les voies métaboliques des microalgues qui sont en lien avec les molécules que l'on cherche à produire. L'effort de recherche prend ainsi souvent pour point de départ les voies et processus métaboliques caractérisés chez les plantes avant de rechercher ces voies chez les microalgues étudiées (Zulu et al., 2018; Li-Beisson et al., 2019). Des approches d'ingénierie génétique peuvent ensuite être mises en œuvre pour augmenter la productivité des lipides comme les approches « *push* » (pousser) où l'on augmente la synthèse de précurseurs aux produits que l'on souhaite obtenir, « *pull* » (tirer) où l'on augmente l'expression des enzymes de la voie que l'on souhaite favoriser, « *package* » (emballer) où l'on augmente la stabilité du stockage dans la cellule des molécules recherchées, et « *protect* » (protéger) où l'on inactive la dégradation des produits d'intérêt (Vanhercke et al., 2019). Cette 4^{ème} approche est prometteuse mais nécessite de connaître les voies métaboliques que l'on cherche à inactiver, par exemple celles de la dégradation des lipides.

Le présent travail de thèse a donc cherché à améliorer la connaissance de ces voies, première étape vers l'obtention de souches à fort potentiel de production en lipides d'intérêt. Nous avons sélectionné l'espèce modèle *Phaeodactylum tricornutum* appartenant au groupe des diatomées, une importante famille de microalgues. En particulier, nous avons sélectionné deux écotypes génétiquement distants et couramment étudiés, Pt1 et Pt4, afin de comparer leurs réponses et éventuellement mettre en relation des différences dans leur métabolisme. Notre démarche générale a été de placer les algues dans des conditions d'accumulation de lipides et de caractériser cette accumulation, avant de changer le milieu pour des conditions favorisant la consommation de ces lipides. Des suivis de microscopie, de biochimie et de mesure de l'expression de transcrits ont ensuite été réalisés en carence comme après resupplémentation pour suivre les processus et mécanismes impliqués.

Le premier chapitre du présent manuscrit consiste en une synthèse bibliographique comportant trois parties. La première a pour objectif de présenter notre modèle d'étude *Phaeodactylum tricornutum*, les spécificités des diatomées, les différents écotypes qui appartiennent à cette espèce, les particularités de son génome et de sa biochimie avec une focalisation sur les classes de lipides présentes chez cette espèce. La seconde détaille le métabolisme des lipides chez les diatomées au sens large, aussi bien du côté de l'anabolisme

¹ "perhaps the most significant observation is that the conditions that promote high productivity and rapid growth (nutrient sufficiency) and the conditions that induce lipid accumulation (nutrient limitation) are mutually exclusive"

que des éléments connus du catabolisme. L'anabolisme est détaillé au sens large, de l'acquisition du carbone puis de sa fixation par la photosynthèse jusqu'à la synthèse des acides gras et des différentes classes de lipides. La troisième partie se concentre sur les effets du stress azoté et la façon dont il affecte les voies métaboliques et la dynamique de production de gouttelettes lipidiques.

Le deuxième chapitre rassemble les matériels et méthodes utilisés dans les différentes démarches expérimentales mises en œuvre.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenus sous la forme d'articles scientifiques publiés (parties 1 et 2) ou en préparation (partie 3). La première partie présente les résultats obtenus par une approche de microscopie confocale et en transmission permettant de suivre la dynamique des gouttelettes lipidiques et du plaste au cours d'une carence en azote suivie d'une sortie de carence. La deuxième partie présente une approche bioinformatique qui a permis d'identifier dans le génome de *P. tricornutum* des gènes codant des lipases potentiellement impliquées dans la dégradation des lipides. La troisième partie présente les résultats d'un suivi biochimique et moléculaire destiné à suivre la composition de la biomasse mais aussi l'expression des gènes du métabolisme des lipides et des glucides de réserve pendant la carence et la resupplémentation. Une quatrième partie présente des résultats préliminaires obtenus pour essayer de quantifier deux processus de dégradation des lipides, la lipolyse et la lipophagie, par l'utilisation d'inhibiteur de ces voies.

Ce manuscrit s'achève par un quatrième chapitre qui propose une discussion générale de l'ensemble des résultats, les conclusions que l'on peut en tirer ainsi que des perspectives de recherches futures.

I – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1 – La diatomée modèle *Phaeodactylum tricornutum*

1.1 – Caractéristiques des algues

1.1.1 – Définition générale

Les diatomées, dont fait partie *Phaeodactylum tricornutum*, sont classiquement incluses dans la vaste famille des « algues ». Considérées au sens le plus large, les algues sont les organismes capables de réaliser la photosynthèse oxygénique et qui ne sont pas des plantes, c'est-à-dire qui n'ont pas de racines, de tiges, et de feuilles différenciées (Lee, 2008). Cette définition peu restrictive regroupe ainsi, dans les algues, des organismes provenant d'un grand nombre de groupes taxonomiques distincts. Par exemple en considérant une version récente de l'arbre phylogénétique des eucaryotes regroupant la majorité des espèces connues en 9 super-groupes et quelques lignées orphelines, on trouve des algues dans 5 des 9 super-groupes (**Figure 1**) (Burki et al., 2020; Gololobova and Belyakova, 2022).

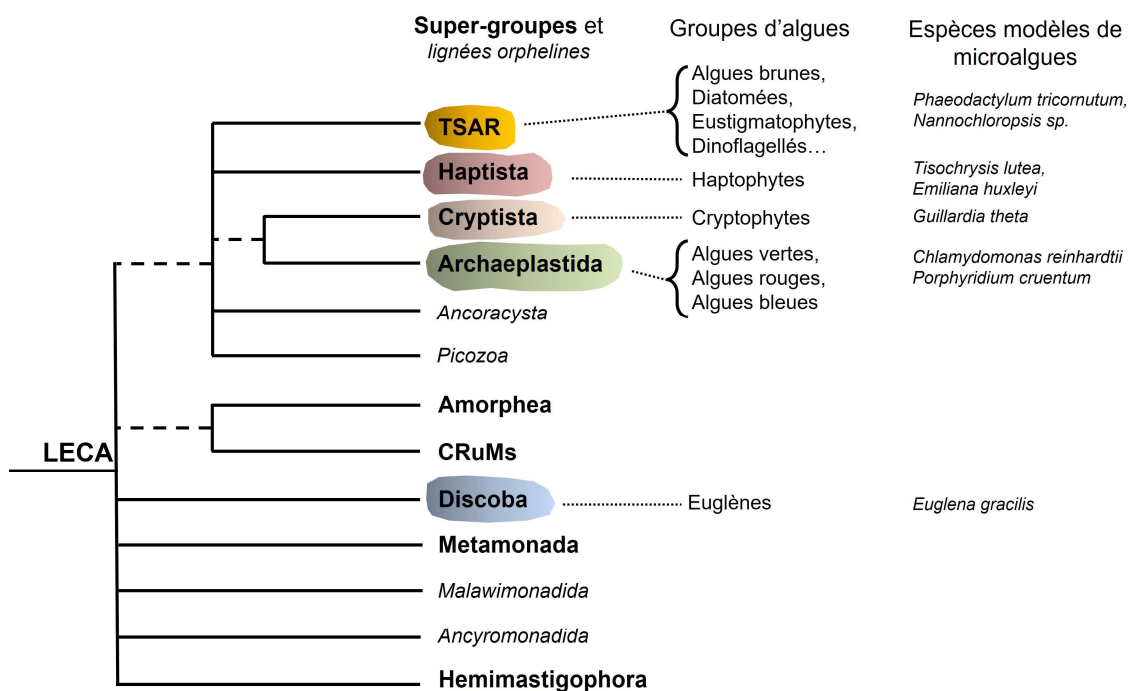


Figure 1 : L'arbre des eucaryotes. Les super-groupes contenant des algues sont entourés en couleur. Les noms usuels des principaux groupes d'algues sont indiqués. Quelques exemples de microalgues modèles sont fournis dans les différents taxons. LECA : Last Eukaryotic Common Ancestor. (Adapté d'après Burki et al., 2020)

En-dehors des eucaryotes, il existe aussi des bactéries qui correspondent à cette définition car elles réalisent la photosynthèse. Ces bactéries sont regroupées dans la division (ou *phylum*) des cyanobactéries (*Cyanophyceae*), également nommées « algues bleu-vert ». Du

fait de leur nature procaryote, elles sont parfois exclues des algues, si l'on considère que ces dernières doivent être des eucaryotes (e.g. Li-Beisson et al., 2019).

1.1.2 – Des histoires évolutives complexes par endosymbioses

Les cyanobactéries ont joué un rôle important dans l'apparition de la photosynthèse chez les eucaryotes. En effet, il y a environ 1,8 milliards d'années, un organisme unicellulaire non-photosynthétique aurait phagocyté et conservé une cyanobactérie au lieu de la digérer. Au cours de l'évolution, la cyanobactérie aurait ensuite été réduite (perte du peptidoglycane notamment) et conservée sous forme de plaste dans les cellules photosynthétiques (Tirichine and Bowler, 2011). Ce plaste est délimité par deux membranes issues des deux membranes caractéristiques des bactéries à Gram négatif (Petroutsos et al., 2014). Les descendants directs de cet événement d'endosymbiose primaire sont les membres du super-groupe des *Archaeplastidae* qui regroupe trois divisions : les *Chloroplastidae* incluant toutes les plantes terrestres et les algues vertes, les *Rhodophytae* aussi nommées algues rouges, et le petit groupe des *Glaucophytae* ou algues bleues (Burki et al., 2020) (**Figure 2**).

L'histoire évolutive des autres algues est plus complexe puisqu'elle implique un ou plusieurs événements d'endosymbiose secondaire : un eucaryote photosynthétique aurait alors été intégré comme endosymbiote dans une cellule eucaryote non photosynthétique. Deux *phyla* d'algues, les *Euglenophytae* et les *Chlorarachniophytae* ont intégré indépendamment des plastes issus d'algues vertes phagocytées, tandis qu'un grand nombre d'autres *phyla* ont intégré des plastes issus d'algues rouges, probablement de manière indépendante (Strasser et al., 2021) (**Figure 2**). Cette « lignée rouge » inclut les *Heterokontophytae* (ou Stramenopiles), les *Haptophytae*, les *Cryptophytae*, les *Dinoflagellatae* (ou Dinoflagellés) et les *Apicomplexae* (Grosche et al., 2014). L'endosymbiose secondaire conduit à la présence d'un plaste complexe entouré en général de 4 membranes : les 2 membranes internes proviennent du plaste de la cellule capturée, la 3^{ème} membrane provient probablement de la membrane plasmique de cette même cellule, tandis que la membrane la plus externe est *a priori* issue de la membrane de phagocytose de la cellule hétérotrophe (Burki, 2017).

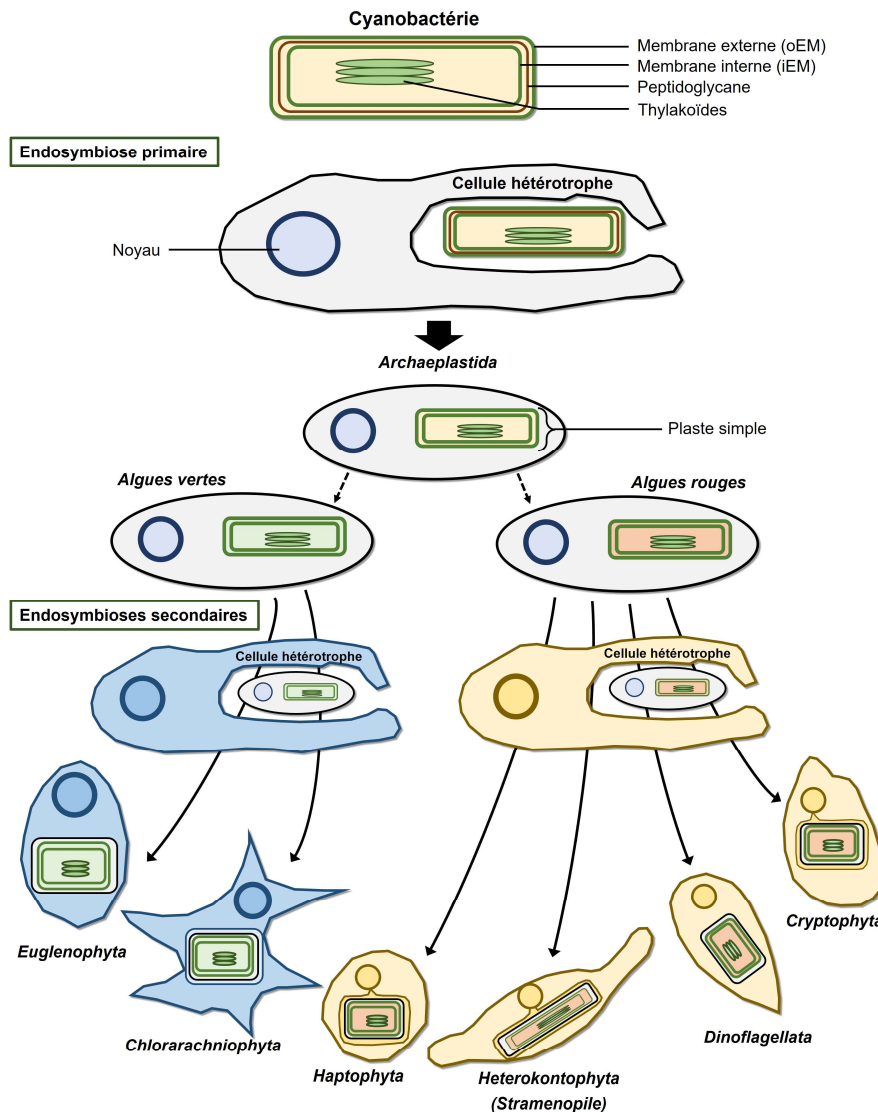


Figure 2 : L'enchaînement des endosymbioses primaires et secondaires dans l'évolution des organismes photosynthétiques. Le schéma regroupe sous une même couleur les événements d'endosymbioses secondaires ayant eu lieu dans la lignée verte ou dans la lignée rouge bien que ces événements soient a priori indépendants. Les Apicomplexae ne sont pas représentés car ces organismes ont conservé leur plaste mais perdu la photosynthèse. (Adapté d'après Grosche et al. (2014) et Petroutsos et al. (2014)).

Il est à noter que certains de ces endosymbiotes secondaires (les *Euglenophytae* et les Dinoflagellés contenant de la péridinine) ne possèdent que 3 membranes autour de leur plaste, possiblement suite à la perte d'une membrane, bien que le mécanisme évolutif à l'origine de cette perte ne soit pas identifié actuellement (Grosche et al., 2014; Waller and Kořený, 2017). Enfin, il a également été observé que certains Dinoflagellés (comme *Kryptoperidinium foliaceum*) sont issus d'une endosymbiose tertiaire où un endosymbiote secondaire a été

capturé et retenu comme plaste très peu réduit ce qui conduit à un « plaste » à 5 membranes (Waller and Kořený, 2017).

L'endosymbiose conduit toujours à une modification importante du génome de la cellule réduite en plaste. Une partie du génome est transférée dans le noyau de la cellule hôte tandis que seul un génome réduit est conservé dans le plaste (Tirichine and Bowler, 2011; Moreira and Deschamps, 2014). Les événements d'endosymbiose secondaire (et d'ordre supérieur) complexifient ainsi la structure du génome et peuvent conduire à des voies métaboliques uniques distinctes de celles trouvées chez les plantes, les animaux, les champignons ou les autres groupes d'eucaryotes.

1.2 – Caractéristiques des diatomées

1.2.1 – Les straménopiles

Parmi la diversité des groupes d'algues, les diatomées appartiennent au super-phylum des Straménopiles. Formellement, ce groupe est défini par la présence au cours de son cycle de vie d'une cellule portant deux flagelles différents : un long flagelle antérieur recouvert de mastigonèmes (sortes de poils) sur une ou deux rangées, et un court flagelle postérieur lisse. On peut ajouter à cette définition la présence de plastes complexes à 4 membranes contenant les chlorophylles *a* et *c* ainsi que la fucoxanthine comme caroténoïde majeure, et la chrysolaminarine (β 1,3 glucane soluble ramifié en β 1,6) comme principal glucide de réserve (Lee, 2008).

Ces critères traditionnels associés à des critères génétiques ont permis de rassembler dans les straménopiles des organismes *a priori* très divers, incluant les macroalgues brunes (*Phaeophyceae*) de plusieurs mètres de long comme le varech géant (*Macrocystis pyrifera*), les parasites oomycètes dont fait partie le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*), ou encore des unicellulaires comme les *Eustigmatophyceae* modèles du genre *Nannochloropsis* et la très grande division des diatomées (*Bacillariophytae*).

1.2.2 – La classification des diatomées

Les diatomées regroupent un grand nombre d'espèces, qui varie de 1800 à 200 000 suivant les estimations (Malviya et al., 2016) sans clair consensus dans les estimations récentes entre environ 20 000 espèces (Guiry, 2012) et 100 000 espèces (Mann and Vanormelingen, 2013). Ces microalgues ont pour particularité principale d'entourer leurs cellules d'une enveloppe faite de silice (SiO_2) amorphe nommée frustule. Cette paroi est constituée de deux parties emboîtées l'une dans l'autre comme une boîte de Pétri, qu'on appelle thèques : l'épithèque correspond à la partie la plus grande, où vient s'emboîter l'hypothèque. Chacune de ces dernières peut être divisée en deux parties, les valves (épivalve et hypovalve) qui sont les

« couvercles » de chaque thèque et les cingulum (épicingulum et hypocingulum) attachés au bord de chacune des deux valves (**Figure 3A**).

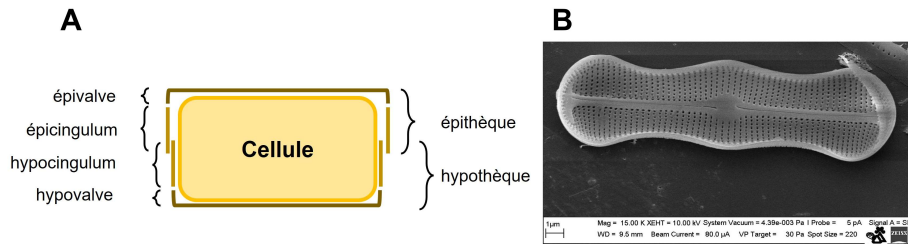


Figure 3 : Morphologie du frustule des diatomées. A : Schéma représentant une diatomée en coupe. B : Vue au microscope électronique à balayage d'une valve de la diatomée *Achanthes trinodis* permettant d'observer les ornements du frustule (crédit : Nicola Angeli/MUSE, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons).

Le frustule est ornementé par des stries, des côtes et des excroissances, ainsi que de nombreuses perforations où se déroulent les échanges avec le milieu extérieur (**Figure 3B**). Chez certaines espèces, il y a également présence d'un raphé, sillon longitudinal d'où la diatomée peut excréter du mucus qui confère une motilité à la cellule. Traditionnellement, les diatomistes ont utilisé la structure et l'ornementation des frustules pour classer les espèces. Il y a deux grandes morphologies de diatomées : les diatomées centriques à symétrie centrale et les diatomées pennées (ou pennales) à symétrie bilatérale (**Figure 4**). Par l'analyse de caractères physiologiques conservés au cours de l'évolution et l'analyse des génomes, trois grandes classes de diatomées ont été proposées, bien que cette taxonomie soit encore sujette à débat : les diatomées centriques à symétrie radiale, donc circulaire (*Coscinodiscophyceae*) ; les *Mediophyceae* qui comptent les diatomées centriques radiales Thalassiosirales et les diatomées centriques multipolaires (de formes pouvant être triangulaires ou pentagonales par exemple) ; et les diatomées pennées (*Bacillariophyceae*). Les diatomées pennées peuvent elles-mêmes être subdivisées suivant la présence ou non d'un raphé (respectivement diatomées raphides et araphides) (Medlin, 2014).



Figure 4 : Exemple d'arrangement de diatomées sur une lame de microscope présentant un échantillon de leur diversité morphologique. (crédit : Wipeter, CC BY-SA 3.0 <<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons ; le bord noir de l'image originale a été détourné)

1.2.3 – L'organisation interne des diatomées

L'histoire évolutive des straménopiles a doté les diatomées d'une organisation intracellulaire complexe dont une caractéristique importante est le plaste à 4 membranes (**Figure 5**).

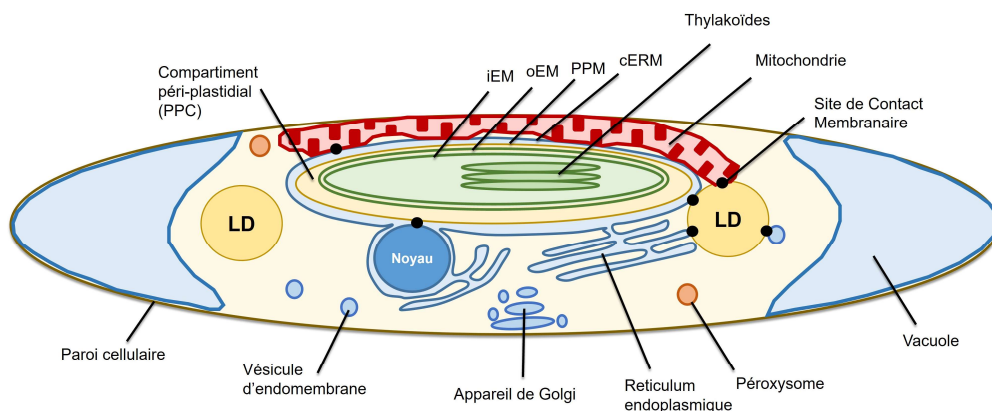


Figure 5 : Schéma de l'organisation interne d'une diatomée pennée. *cERM* : chloroplatic Endoplasmic Reticulum Membrane, *iEM* : inner Enveloppe Membrane, *LD* : Lipid Droplet, *oEM* : outer Enveloppe Membrane, *PPC* : Periplastidial Compartment, *PPM* : Periplastidial Membrane.

Chez les diatomées, la membrane la plus externe du plaste (*cERM*, *chloroplatic Endoplasmic Reticulum Membrane*) est continue avec le réticulum endoplasmique (RE) ainsi qu'avec la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. La membrane suivante (*PPM*, *Periplastidial Membrane*) établit des sites de contact membranaires (MCS, *Membrane Contact Sites*) avec la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. De plus, cette membrane contient le cytoplasme réduit de l'endosymbiote secondaire, nommé compartiment périplastidial (*PPC*, *Periplastidial Compartment*), où un réseau de vésicules a été découvert par microscopie

électronique à transmission (Flori et al., 2016). Cependant, aucune protéine habituellement impliquée dans la formation de vésicules n'a été identifiée dans le PPC. Le fonctionnement de ce réseau est donc à ce jour inconnu, de même que ses fonctions, bien qu'il puisse avoir un rôle dans l'import de protéines ou d'autres composés (Flori et al., 2016). Les deux membranes suivantes sont les membranes dérivant de l'enveloppe du plaste primaire et nommées respectivement membrane externe de l'enveloppe (oEM, *outer Enveloppe Membrane*) et membrane interne de l'enveloppe (iEM, *inner Enveloppe Membrane*).

À l'intérieur du plaste, on trouve des groupes parallèles de thylakoïdes empilés par trois sur toute leur longueur, contrairement aux plastes "classiques" des plantes et algues vertes qui contiennent des empilements de thylakoïdes (les *grana*) reliés entre eux par des thylakoïdes allongés (les *lamellae*). Ces thylakoïdes sont dans le stroma, contenu aqueux du plaste. Dans la partie centrale du plaste, on trouve un pyrénoloïde, compartiment impliqué dans la concentration du CO₂ pour la photosynthèse (Schober et al., 2019).

Les diatomées possèdent par ailleurs un petit nombre de mitochondries dont le nombre dépend des espèces. *P. tricornutum* possède ainsi une seule mitochondrie de forme irrégulière étendue le long du plaste avec lequel elle établit des MCS (Flori et al., 2017).

Dans certaines conditions de stress, comme une carence en azote par exemple, les diatomées accumulent des lipides de réserve sous forme de triglycérides qui sont stockés dans des gouttelettes lipidiques (LD, *Lipid Droplets*). Ces organites se retrouvent en différents nombres et diamètres suivant les espèces (Maeda et al., 2017). Ils contiennent également de nombreuses protéines.

L'appareil de Golgi est également présent proche du noyau dans le cytosol, tandis que des vésicules sont observées dans l'ensemble du cytosol (Galas et al., 2021). Il existe chez les diatomées des vésicules particulières nommées *silica deposition vesicles* où sont formées les parties siliceuses du frustule (Kühn and Brownlee, 2005). Le cytosol comprend aussi des vacuoles où sont notamment stockés la chrysolaminarine et les ions nitrate prélevés dans le milieu (McCarthy et al., 2017). Enfin, on trouve des "péroxyosomes" ou glyoxysomes (Winkler and Stabenau, 1995) dont une particularité est de ne pas présenter d'activité enzymatique de type catalase et peroxydase.

1.2.4 – Aspects écologiques et place dans la bioéconomie

Les diatomées sont présentes dans tous les milieux aquatiques, marins comme d'eau douce. On les trouve également dans certains écosystèmes terrestres, comme les sols (Foets et al., 2020) ou les lichens (Bertrand et al., 2016). Elles dominent de nombreux écosystèmes, en particulier les zones d'*upwelling* équatorial ou côtier, et les océans situés au-delà des 40 degrés de latitude, où elles peuvent représenter 100% de la productivité primaire (Rousseaux and Gregg, 2013).

L'une des raisons de leur domination est le frustule, dont la fabrication demande peu d'énergie par rapport à une paroi de glucides (Pančić and Kiørboe, 2018) : elles peuvent ainsi croître rapidement dans ces milieux variables. De manière générale, les diatomées sont adaptées à des milieux turbulents bien mélangés (Falkowski et al., 2004; Benoiston et al., 2017).

Étant donné leur prédominance dans de nombreuses régions, les diatomées réalisent 20% de la productivité primaire mondiale (Nelson et al., 1995; Field et al., 1998) et elles se trouvent donc à la base des réseaux trophiques des océans (Armbrust, 2009). Pour la même raison, ce sont des acteurs importants des cycles biogéochimiques, notamment celui de la silice (Nelson et al., 1995).

Outre leur importance écologique, la biomasse des diatomées peut avoir de nombreuses applications industrielles dans différents secteurs économiques (Butler et al., 2020; Yang et al., 2020; Sharma et al., 2021) (**Figure 6**). Ainsi, pendant une carence en nutriments, certaines diatomées comme *P. tricornutum* ou *Fistulifera solaris* peuvent accumuler de grandes quantités de lipides neutres sous forme de triglycérides qui représentent jusqu'à 60% du contenu des cellules en matière sèche chez cette seconde espèce (Matsumoto et al., 2014). Les acides gras contenus dans les triglycérides peuvent être convertis en esters méthyliques d'acides gras pour une utilisation comme biodiésel. La composition en acides gras des lipides neutres des diatomées est compatible avec les standards de qualité internationaux pour ce biocarburant (Maeda et al., 2017). Toutefois, par comparaison aux sources plus classiques de biodiésel, cette application n'est pas encore économiquement compétitive comme présenté dans l'introduction générale.

De plus, la biomasse des diatomées est en général riche en lipides contenant des acides gras polyinsaturés oméga 3 à très longue chaîne, en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA, *Eicosapentaenoic Acid*) bénéfique pour la santé cardiovasculaire (Ulmann et al., 2017). La richesse en acides gras oméga 3 des diatomées (et d'autres microalgues) est également recherchée en alimentation animale pour l'aquaculture, notamment pour remplacer les huiles et farines de poissons. La biomasse des diatomées contient d'autres composés permettant une valorisation en alimentation humaine comme animale. Ces microalgues ont en général

une haute teneur en protéines, elles contiennent comme glucide de réserve de la chrysolaminarine aux propriétés antioxydantes, antitumorales et immunomodulatrices (Xia et al., 2014; Yang et al., 2020), ainsi que des phytostérols qui peuvent avoir une action hypocholestérolémiante (Ulmann et al., 2017), ou des pigments antioxydants, en particulier la fucoxanthine qui possède également des propriétés anti-cancéreuse, anti-obésité, anti-diabétique et contre la maladie d'Alzheimer (Yang et al., 2020).

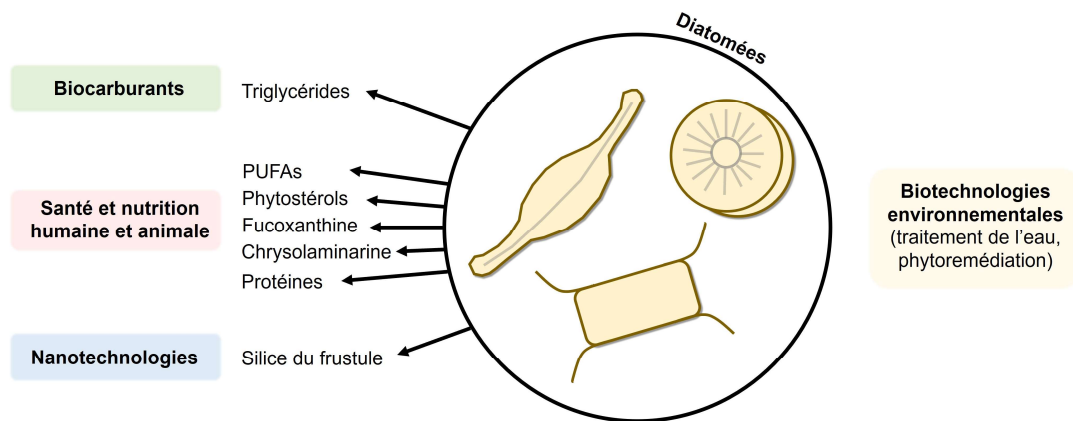


Figure 6 : Quelques exemples d'applications industrielles des diatomées. PUFAs : Polyunsaturated Fatty Acids.

D'autres valorisations économiques des diatomées incluent leur utilisation pour les biotechnologies environnementales comme le traitement de l'eau ou la phytoremédiation de molécules toxiques (par exemple le phénol), ainsi que l'utilisation de la silice du frustule microporeux, par exemple comme système ciblé d'administration de médicaments, pour l'immobilisation d'enzymes ou comme nanomatériaux dans des batteries lithium-ions (Sharma et al., 2021).

1.2.5 – Les particularités du génome des diatomées et l'émergence d'espèces modèle

Du fait de leur importance écologique et économique, les génomes de plusieurs diatomées ont été séquencés. Le premier fut celui de la diatomée centrique *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al., 2004), suivi de la diatomée pennée avec raphé *P. tricornutum* (Bowler et al., 2008), dont le génome plastidial a également été séquencé (Oudot-Le Secq et al., 2007). L'analyse des génomes de ces deux espèces a permis de mettre en avant des particularités métaboliques comme la présence du cycle ornithine urée, présent chez les animaux mais absent chez les autres algues et les plantes (Allen et al., 2011). En outre, ces génomes ont montré qu'environ 5% des gènes de diatomées ont été obtenus via des transferts horizontaux avec des bactéries, comme par exemple le gène indexé *Phatrdraft3_J11014* de *P. tricornutum*,

qui code une acyl-CoA déshydrogénase mitochondriale similaire à des homologues bactériens (Jallet et al., 2020).

Les plus anciens fossiles de diatomées sont centrées et datent de 185 millions d'années. Les premiers fossiles de diatomées pennées datent quant à eux de 90 millions d'années, point de divergence apparent entre les deux principales morphologies (Bowler et al., 2008). Malgré cette séparation récente, les génomes de *P. tricornutum* et de *T. pseudonana* ne partagent que 57% de gènes en commun : cette divergence est du même ordre de grandeur que celle observée entre l'être humain et le poisson globe, qui a pourtant eu lieu il y a 550 millions d'années (Bowler et al., 2008). La diversité génétique, écologique et biochimique des diatomées a conduit au séquençage d'espèces variées dont les oléagineuses *Cyclotella cryptica* (Traller et al., 2016) et *F. solaris* (Tanaka et al., 2015), la diatomée océanique adaptée à la limitation en fer *Thalassiosira oceanica* (Lommer et al., 2012) ou celle adaptée au froid *Fragilariopsis cylindrus* (Mock et al., 2017), la diatomée productrice de neurotoxines *Pseudo-nitzschia multistriata* (Basu et al., 2017) ou encore les diatomées qui vivent associées en chaînes de l'espèce *Skeletonema marinoi* (Johansson et al., 2019). Un projet en cours nommé le « 100 Diatom Genomes Project » (<https://us2b.univ-nantes.fr/projets/100-diatom-genomes-project/>) a pour objectifs d'obtenir une meilleure connaissance de la grande diversité d'espèces de diatomées en séquençant 100 génomes représentatifs de différents groupes. Par des analyses comparatives, ce projet cherche notamment à identifier les adaptations métaboliques spécifiques de ces microalgues et de sous-groupes de ces microalgues.

Considérée comme le principal modèle de diatomée pennée oléagineuse, nous avons utilisé *P. tricornutum* dans ce travail de thèse pour étudier les réponses à une carence en azote puis à une resupplémentation.

1.3 – *Phaeodactylum tricornutum*

1.3.1 – Les écotypes de *Phaeodactylum tricornutum* et sa pléomorphie

P. tricornutum a été découverte et isolée en 1897 par Bohlin au large de Plymouth. Elle est alors décrite comme étant une diatomée triradiée. En 1910, Allen et Nelson décrivent et isolent *Nitzschia closterium forma minutissima*, une diatomée pennée capable de croître dans une grande variété de milieux et conditions de cultures, ce qui lui assura d'être étudiée dans de nombreux laboratoires. Il a ainsi été découvert que cette diatomée possédait un frustule très pauvre en silice, sa paroi étant surtout constituée de glucides. Ainsi, contrairement à la plupart des diatomées, elle peut être cultivée sans silice ajoutée dans le milieu de culture (Lewin et al., 1958).

Au fil des années, plusieurs signalements de “contamination” des cultures fusiformes par d’autres diatomées ovales et triradiées permirent de découvrir qu’il ne s’agissait en fait que d’une seule espèce, *P. tricornutum*, capable de pléomorphie, c’est à dire d’adopter plusieurs morphologies. Les cellules peuvent ainsi être ovales, fusiformes, triradiées ou, plus rarement, cruciformes, et changer entre ces différentes modalités (**Figure 7**). Une même culture présente souvent les différentes formes, cependant, les proportions relatives de ces dernières peuvent changer avec les changements d’environnement, notamment de température et de salinité (Tesson et al., 2009; He et al., 2014; Song et al., 2020). De plus, la forme majoritaire observée en culture dépend de la souche étudiée.

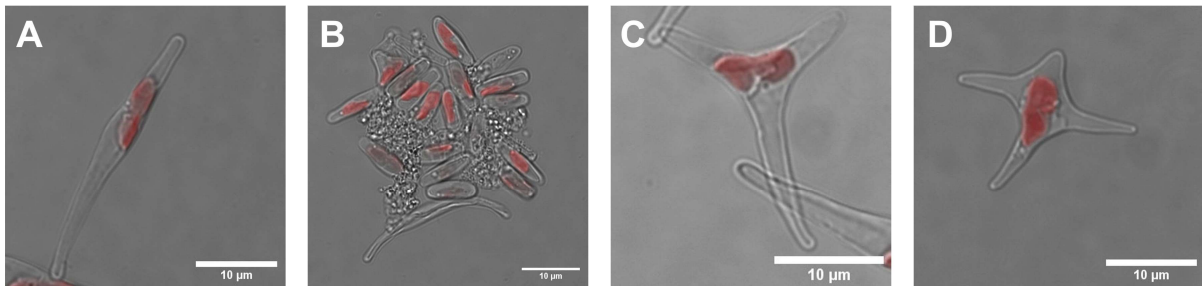


Figure 7 : Micrographies obtenues au microscopie confocale montrant la variété de morphologies possibles chez *P. tricornutum*. L’autofluorescence de la chlorophylle est représentée en rouge. A : fusiforme ; B : amas contenant une majorité de formes ovales ; C : triradiée ; D : possible cellule cruciforme. La barre d’échelle mesure 10 µm.

P. tricornutum a en effet été isolée dans divers endroits du monde, ce qui a permis l’obtention d’au moins 17 souches (écotypes) nommées Pt1 à Pt17. Des cultures monoclonales de la souche Pt1 ont également été réalisées, donnant notamment la souche fusiforme Pt1 8.6 utilisée pour le premier séquençage du génome (de Martino et al., 2007; Bowler et al., 2008). Les génomes des souches indexées 1 à 17 ont été séquencés, ce qui a permis d’identifier 6 groupes génotypiques nommés A, B, C, D, E et F : le A regroupe Pt1, Pt2, Pt3, Pt9, Pt15 et Pt17 ; le B n’inclut que Pt4 ; le C regroupe Pt5, Pt10 et Pt11 ; le D regroupe Pt6, Pt7 et Pt8 ; le E inclut Pt12, Pt13 et Pt14 ; tandis que le F n’inclut que Pt16. Il est intéressant de noter que les groupes ainsi définis ne sont pas délimités par le lieu d’isolation des souches (**Figure 8**). Les souches regroupées ainsi sont également similaires du point de vue des fonctions codées par leurs gènes. Pt4 est donc la plus éloignée de toutes les autres tant du point de vue génétique que fonctionnel (de Martino et al., 2007; Rastogi et al., 2020; Chaumier et al., 2023).



Figure 8 : Lieux d'isolation (A) et groupes génotypiques (B) des différents écotypes de *P. tricornutum* dont le génome a été séquencé. A : Carte Mercator obtenue sur Fla-shop.com (30/06/2023). La souche Pt3 est issue d'un clone de la souche Pt2. B : Arbre phylogénétique des écotypes adapté de Chaumier et al. (2023).

1.3.2 – Une espèce modèle pour la génétique

En tant qu'espèce modèle, le génome de *P. tricornutum* a rapidement été séquencé et annoté. En 2005, une première version de 31 Mb a été publiée (Phatr1), suivie en 2008 d'une seconde version (Phatr2) ré-annotée et améliorée qui est devenue le génome de référence accessible sur le portail « Phycosm » du Joint Genome Institute (JGI, <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Phatr2/Phatr2.home.html>). La version Phatr2 mesure 27,4 Mb et comporte 10 402 gènes prédits. Cependant, beaucoup de modèles de gènes y demeuraient incomplets. Avec les progrès importants des technologies de séquençage et notamment les études de transcriptomes par RNA-seq, une troisième annotation (Phatr3) a été réalisée récemment (Rastogi et al., 2018), décrivant 12 233 gènes et accessible sur le portail "Ensembl!". Cette version est celle utilisée par le portail DiatOmicBase (<https://www.diatomicsbase.bio.ens.psl.eu/>), base de données omiques (notamment de transcriptomes) obtenues chez les principales espèces modèles de diatomées. Malgré les efforts d'annotation, il reste chez *P. tricornutum* environ 15% de protéines annotées comme *hypothetical protein* ou *predicted protein*, c'est-à-dire dont la fonction n'a pas pu être identifiée, ce qui est toutefois beaucoup moins que chez la plupart des microalgues dont le génome est disponible (Sahoo et al., 2020).

Les gènes issus des deux premières versions sont désignés par la nomenclature PhatrXXXXX, ou PhatdraftXXXXX. C'est ce modèle que l'on trouve dans la base de données "Gene" du NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), XXXXX représentant un nombre unique pour chaque gène. Les gènes issus de la dernière annotation sont notés

Phatr3_JXXXXX pour les gènes dont le modèle a été précisé ou est resté inchangé, et Phatr3_EGXXXXX pour les nouveaux gènes découverts ou issus de la fusion de deux gènes précédents. C'est cette nomenclature que nous utiliserons ici.

En parallèle de ces informations génomiques, plusieurs outils de transformation génétique ont été développés. *P. tricornutum* a ainsi été transformée avec succès par biolistique (Apt et al., 1996), mais aussi par électroporation (Niu et al., 2012; Miyahara et al., 2013; Zhang and Hu, 2014) et par conjugaison bactérienne via l'introduction d'un épisode que les cellules conservent en se divisant (Karas et al., 2015; Moosburner et al., 2020). Les outils d'édition du génome sont également développés pour cette diatomée, comme les méganucléases et les TALENs (Daboussi et al., 2014; Hao et al., 2018) ou le système CRISPR-Cas9 (Nymark et al., 2016; Taparia et al., 2022). Tous ces outils permettent d'étudier le métabolisme de *P. tricornutum* par des études de génétique fonctionnelle. L'expression d'un gène en particulier peut être réduite (KD, *Knockdown*) par des ARN interférents ou introduction d'une version antisens du gène (Levitan et al., 2015a; Barka et al., 2016), voire éteinte (KO, *Knockout*) par édition du gène (McCarthy et al., 2017). Au contraire l'expression du gène peut être stimulée (OE, *Overexpression*) par introduction d'un exemplaire supplémentaire du gène étudié, exprimé sous promoteur fort (Haslam et al., 2020). Ces méthodes sont notamment utilisées pour comprendre le métabolisme de *P. tricornutum* et des diatomées en général.

1.3.3 – Les lipides présents chez *Phaeodactylum tricornutum*

En tant que diatomée, donc straménopile, la composition biochimique de *P. tricornutum* inclut la chrysolaminarine comme glucide de stockage, les chlorophylles *a* et *c* ainsi que la fucoxanthine comme pigments photosynthétiques, ainsi que de nombreuses classes de lipides. Étant une espèce modèle de diatomée oléagineuse, le lipidome de *P. tricornutum* a également été bien caractérisé et sa composition va être détaillée dans cette partie.

Les lipides sont un ensemble de molécules biologiques diverses dont les caractéristiques communes sont la solubilité dans les solvants apolaires comme le chloroforme et la non-miscibilité à l'eau. D'un point de vue chimique, ils peuvent être définis comme les composés issus de la condensation de sous-unités cétoacyl ou bien de sous-unités isoprènes (Fahy et al., 2011). On trouve des lipides entièrement hydrophobes, les lipides neutres (LN) que l'on peut distinguer des lipides amphiphiles, les lipides polaires.

1.3.3.1 – Les acides gras

Les acides gras sont des molécules constituées d'une chaîne aliphatique (c'est à dire constituée d'atomes de carbone reliés entre eux) terminée par une fonction carboxyle (acide carboxylique). Les atomes de carbone sont en général en nombre pair allant de 8 à 30 carbones. Chez *P. tricornutum*, la longueur de la chaîne varie de 14 à 24. Les acides gras à chaîne comprise entre 14 et 18 atomes de carbone sont nommés acides gras à longue chaîne, ceux de 20 à 24 atomes de carbone sont nommés acides gras à très longue chaîne.

Si tous les atomes de carbone sont reliés entre eux par des simples liaisons, l'acide gras est dit saturé (SFA, *Saturated Fatty Acid*). S'il y a au moins une double liaison carbone-carbone (ou insaturation), il est dit monoinsaturé (MUFA, *Monounsaturated Fatty Acid*). S'il y a deux ou plus (jusqu'à 6) doubles liaisons, il est dit polyinsaturé (PUFA, *Polyunsaturated Fatty Acid*). Les insaturations sont toujours séparées par deux liaisons simples.

La longueur ainsi que le nombre et la position des insaturations des acides gras permettent de les définir. Les acides gras sont souvent désignés par la formule C_x:y où x est le nombre d'atomes de carbone dans la chaîne et y le nombre d'insaturations : C16:0 désigne ainsi l'acide hexadécanoïque, acide gras saturé à 16 atomes de carbone. Lorsque des insaturations sont présentes, leur position peut être précisée en partant du carbone portant l'acide carboxylique (carbone alpha, α) ou bien du carbone en bout de chaîne (carbone oméga, ω). Dans le premier cas, toutes les doubles liaisons sont indiquées après le symbole Delta (Δ) en exposant ; dans le second cas, seule la double liaison la plus proche du carbone ω est indiquée par l'abréviation ω z ou n-z, z étant le rang du carbone portant la double liaison. Enfin, les acides gras ont en général un nom vernaculaire lié à leur origine biologique ainsi qu'un nom issu de la nomenclature chimique. L'acide gras présentant 18 carbones et deux insaturations est ainsi nommé acide linoléique, acide 9,12-octadécadiénoïque, C18:2 ω 6, C18:2 n-6 ou C18:2 ^{Δ 9,12}.

Les acides gras sont considérés comme étant la sous-unité de base de la plupart des lipides des cellules. De fait, ils n'existent généralement pas *in vivo* sous forme d'acides gras libres (AGL) car ils sont cytotoxiques à cause de leurs propriétés détergentes. Cependant, certaines études rapportent la présence d'une classe d'AGL dans les extraits lipidiques de diatomées. C'est en général le marqueur d'une dégradation d'autres classes de lipides pendant la récolte de la biomasse, l'extraction des lipides ou le stockage (Bergé et al., 1995; Budge and Parrish, 1999; Balduyck et al., 2017). Dans ce cas, les AGL migrent avec les LN car leur chaîne aliphatique les rend principalement apolaires.

Le **tableau I** récapitule les différentes nomenclatures des principaux acides gras présents chez *P. tricornutum*.

Tableau I : Les principaux acides gras identifiés chez *P. tricornutum*

Formule	Nomenclature	Vernaculaire	Oméga	Delta	Abr.
	Tétradécanoïque	Myristique	C14:0	C14:0	
	Hexadécanoïque	Palmitique	C16:0	C16:0	
	9-Hexadécénoïque	Palmitoléique	C16:1 n-7	C16:1 ^{A9}	
	9,12- Hexadécadiénoïque		C16:2 n-4	C16:2 ^{A9,12}	
	6,9,12- Hexadécatriénoïque		C16:3 n-4	C16:3 ^{A6,9,12}	
	Octadécanoïque	Stéarique	C18:0	C18:0	
	9-Octadécénoïque	Oléique	C18:1 n-9	C18:1 ^{A9}	
	9,12-Octadécadiénoïque	Linoléique	C18:2 n-6	C18:2 ^{A9,12}	
	9,12,15-Octadécatriénoïque	α -Linoléique	C18:3 n-3	C18:3 ^{A9,12,15}	ALA
	6,9,12-Octadécatriénoïque	γ -Linoléique	C18:3 n-6	C18:3 ^{A6,9,12}	GLA
	6,9,12,15- Octadecatétraénoïque	Stéaridonique	C18:4 n-3	C18:4 ^{A6,9,12,15}	
	5,8,11,14-Eicosatétraénoïque	Arachidonique	C20:4 n-6	C20:4 ^{A5,8,11,14}	ARA
	5,8,11,14,17- Eicosapentaénoïque		C20:5 n-3	C20:5 ^{A5,8,11,14,17}	EPA
	4,7,10,13,16,19- Docosahexaénoïque		C22:6 n-3	C22:6 ^{A4,7,10,13,16,19}	DHA
	Tétracosanoïque	Lignocérique	C24:0	C24:0	

1.3.3.2 – Les lipides neutres

La plupart des lipides présents dans les cellules de diatomées sont des glycérolipides. Ils sont formés par estérification d'un ou plusieurs acides gras avec une molécule de glycérol. Le glycérol est une molécule à 3 carbones dont chacun porte une fonction chimique hydroxyle (alcool) où viennent se greffer les chaînes d'acides gras (**Figure 9**). Chacun des trois atomes de carbone du glycérol est identifié par son nombre stéréospécifique (*stereospecific number*, *sn-1*, *sn-2* ou *sn-3*) qui permet de désigner la position des différents acides gras (ou autres groupes estérifiés) (**Figure 9A**).

Les LN les plus abondants sont les triglycérides (ou triacylglycérol, TG) qui constituent les lipides de réserve de la plupart des êtres vivants. Les TG sont formés par réaction

d'estérification entre trois acides gras et une molécule de glycérol (**Figure 9B**). Les acides gras estérifiés peuvent être identiques ou différents et définir ainsi différentes espèces de TG.

Les diglycérides (ou diacylglycérols, DG), sont formés par estérification de deux acides gras avec un glycérol, en positions *sn*-1 et *sn*-2 (DG1,2) ou *sn*-1 et *sn*-3 (DG1,3). Ce sont des intermédiaires métaboliques importants dans toutes les voies qui impliquent des glycérolipides (lipides formés à partir de glycérol).

Les monoglycérides (ou monoacylglycérols, MG), sont formés de la même façon en estérifiant un acide gras en position *sn*-1 ou *sn*-2 d'un glycérol (la position *sn*-3 étant dans ce cas équivalente à la position *sn*-1).

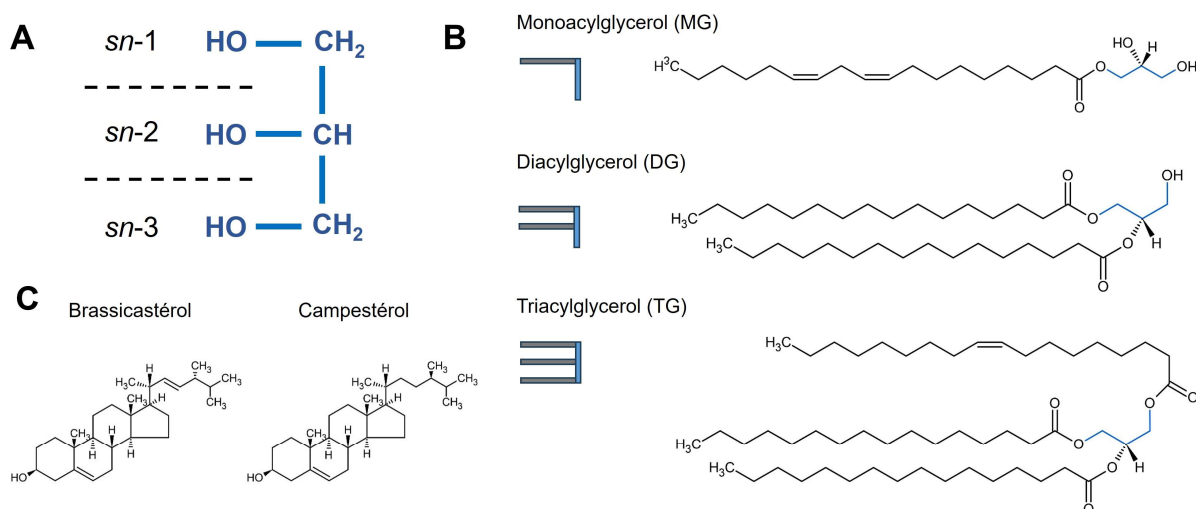


Figure 9 : Le glycérol et les principales classes de lipides neutres. A : La molécule de glycérol ; B : Les glycérolipides neutres ; C : Les deux stérols présents chez *P. tricornutum*. Les structures ont été visualisées avec le freeware Chemsketch et obtenues à partir de la base de données LIPID MAPS®.

Les stérols sont également des composants des lipides neutres, bien qu'ils ne soient pas des glycérolipides. Ce sont des composants des membranes cellulaires dont ils régulent la perméabilité et la fluidité. Ils ont aussi des fonctions métaboliques de régulation de certaines enzymes membranaires comme les pompes ATPases (Hartmann, 1998). Quarante-quatre stérols ont été identifiés sur un échantillon de 106 espèces de diatomées, mais aucun ne semble spécifique d'une classe de diatomée particulière. Chez *P. tricornutum*, le stérol majoritaire est le 24-methylcholest-5,22-dien-3 β -ol, aussi appelé brassicastérol, qui représente 99% des stérols, le 1% restant étant du 24-methylcholest-5-en-3 β -ol ou campestérol (Rampen et al., 2010) (**Figure 9C**). Certains stérols peuvent être estérifiés par un acide gras ce qui donne la classe des esters de stérol.

1.3.3.3 – Les lipides polaires

1.3.3.3.1 – Les phospholipides

Les phospholipides (PL) sont des glycérolipides polaires dont la position *sn*-3 est estérifiée à un groupement phosphate, définissant une “tête polaire”. Les PL sont les constituants majoritaires de la plupart des membranes cellulaires. Les espèces majoritaires de PL présentes *in vivo* sont estérifiées par des acides gras en positions *sn*-1 et *sn*-2. L'acide phosphatidique (PA, *Phosphatidic Acid*) possède un simple groupement phosphate comme tête polaire, mais d'autres espèces peuvent être produites par liaison de différentes molécules sur ce groupement phosphate : la liaison d'une chaîne choline donne la phosphatidylcholine (PC), et on obtient de même la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylinositol (PI) et le phosphatidylglycérol (PG) (**Figure 10**). La PC est le PL principal de la membrane plasmique et des membranes du réticulum endoplasmique, tandis que le PG est le PL majoritaire dans les membranes du plaste (Li-Beisson et al., 2019). La phosphatidylsérine (PS) est également commune dans le monde vivant bien qu'on ne la retrouve pas chez *P. tricornutum* (Abida et al., 2015).

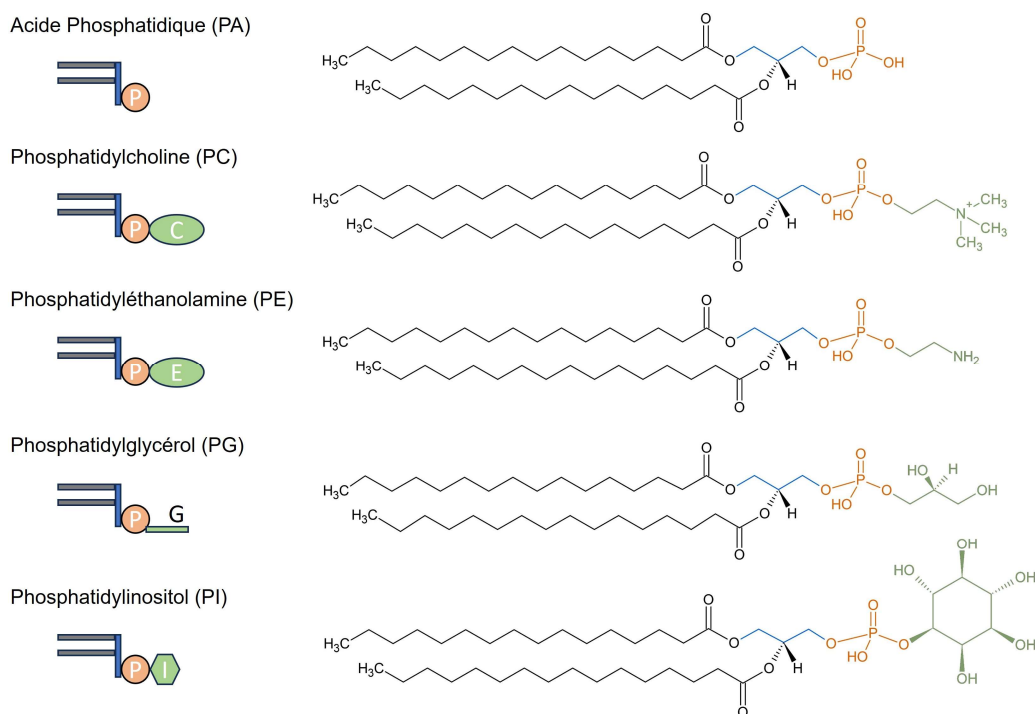


Figure 10 : Les principaux phospholipides présents chez *P. tricornutum*. Les structures ont été visualisées avec le freeware Chemsketch et obtenues à partir de la base de données LIPID MAPS®

Il existe aussi des PL dont seule la position *sn*-1 est estérifiée par un acide gras, ce qui donne de l'acide lysophosphatidique (LPA, *Lysophosphatidic Acid*). Ce sont des intermédiaires métaboliques dont la tête polaire peut également être estérifiée par les mêmes chaînes que les autres PL, comme la lysophosphatidylcholine (LPC) détectée chez *P. tricornutum* (Huang et al., 2019).

1.3.3.3.2 – Les glycolipides

Les glycolipides (GL) sont des lipides polaires dont la tête polaire est constituée d'un ou plusieurs oses. Ce sont les constituants principaux des membranes des thylakoïdes. Chez *P. tricornutum* on en trouve trois sortes, le monogalactosyl diacylglycérol (MGDG) dont la tête polaire est constituée d'un galactose, le digalactosyl diacylglycérol (DGDG) à deux galactoses et le sulfoquinovosyl diacylglycérol (SQDG) estérifié à un sulfoquinovose, un sucre sulfaté (**Figure 11**).

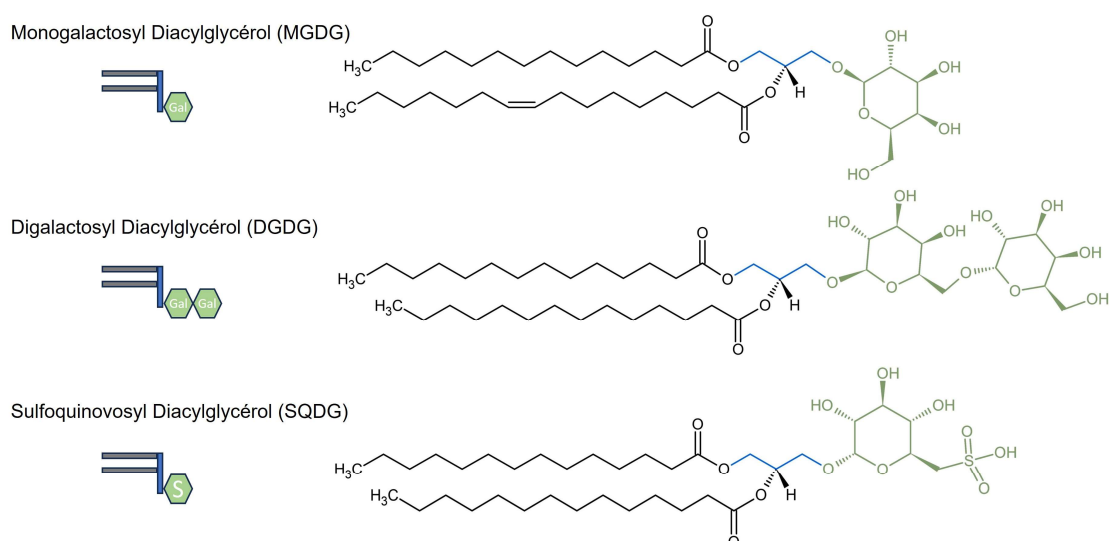


Figure 11 : Les principaux glycolipides présents chez *P. tricornutum*. Les structures ont été visualisées avec le freeware Chemsketch et obtenues à partir de la base de données LIPID MAPS®

Deux GL putatifs supplémentaires ont été observés chez *P. tricornutum* dans un précédent travail de thèse au laboratoire (Huang, 2018). Un lipide constitué de SQDG dont la tête polaire est estérifiée par de l'acide eicosapentaénoïque C20:5 n-3 (EPA) a également été trouvé chez *P. tricornutum*, bien que ses fonctions physiologiques éventuelles soient inconnues (Abida et al., 2015; Smith et al., 2021).

1.3.3.3 – Les bétaïne lipides

Chez les diatomées ainsi que d'autres divisions de microalgues comme les Haptophytes, on trouve une autre classe de lipides polaires, les bétaïne lipides (BL), dont la tête polaire est constituée d'une chaîne carbonée portant à la fois une fonction carboxyle et une fonction triméthylammonium (**Figure 12**). Les BL, ou au moins le diacylglycérol triméthylhomosérine DGTS, ont des similarités physico-chimiques avec la PC, et peuvent aussi se trouver dans les membranes du RE, même si du DGTS est présent dans les membranes plastidiales de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Sato, 1992; Yang et al., 2018). En cas de carence en phosphore, les BL remplacent les PL dans les membranes non photosynthétiques. Chez *P. tricornutum*, le BL majoritaire est le diacylglycérol hydroxyméthyltriméthyl-β-alanine (DGTA), bien que le diacylglycérol triméthylhomosérine (DGTS) ait aussi été trouvé dans certaines études (Popko et al., 2016; Huang et al., 2019). Un lyso-bétaïne lipide a également été observé (Huang et al., 2019).

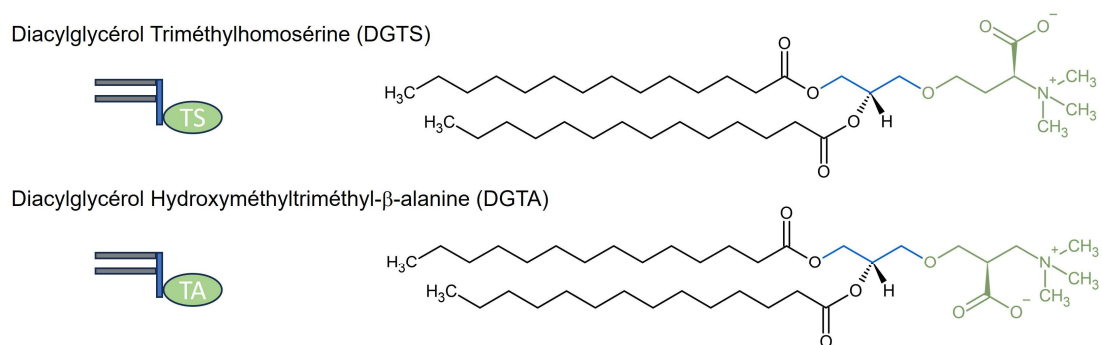


Figure 12 : Les principaux bétaïne lipides présents chez *P. tricornutum*. Les structures ont été visualisées avec le freeware Chems sketch et obtenues à partir de la base de données LIPID MAPS®

1.3.3.4 – Les autres lipides

Enfin, d'autres lipides sont parfois décrits chez les diatomées, comme des sphingolipides qui apparaissent chez *T. pseudonana* pendant une carence en phosphore (Hunter et al., 2018). Les gènes de synthèse des sphingolipides sont également sur-exprimés chez un mutant de *P. tricornutum* dont on a inactivé la nitrate réductase, les sphingolipides étant des lipides de vacuoles où sont stockés les ions nitrate NO_3^- (McCarthy et al., 2017). Des molécules proches des acides gras sont parfois trouvées, comme un alcool gras observé dans les LN de *Skeletonema costatum* (Bergé et al., 1995), ou de l'EPA hydroxylé chez *P. tricornutum* en conditions de stress (Remmers et al., 2018). Enfin, il existe une enzyme de *P. tricornutum* catalysant la synthèse de cérides (*wax esters*), molécules issues de l'estérification d'un acide gras avec un alcool gras (Cui et al., 2013, 2018).

2 – Le métabolisme des lipides des diatomées

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur la réponse des diatomées à une carence en azote (accumulation de lipides neutres) ainsi qu'à une resupplémentation (consommation des lipides neutres). Afin de comprendre ces réponses, il est d'abord nécessaire de connaître les processus et voies métaboliques impliqués dans la synthèse et la dégradation des lipides. L'objet de cette partie est ainsi de présenter l'état des connaissances sur ces mécanismes, depuis l'acquisition du carbone et sa fixation par photosynthèse jusqu'à la dégradation des acides gras par β -oxydation, en passant par la synthèse et la dégradation des différentes classes de glycérolipides et en particulier des TG. La régulation de ces mécanismes lors de variations de la disponibilité en azote dans le milieu sera présentée dans la partie 3.

Il est à noter que, bien que plusieurs génomes aient été séquencés, le métabolisme des lipides chez les diatomées reste mal connu comparé à ceux des animaux, des levures, des plantes, ou même des algues vertes. Le point de départ pour identifier les voies métaboliques chez les diatomées reste ainsi souvent une comparaison entre les gènes prédits dans le génome et ce qui est connu des plantes et algues vertes (Zulu et al., 2018). C'est pourquoi, dans cette partie, certaines voies non élucidées seront présentées à partir des voies établies chez d'autres groupes.

2.1 – De l'assimilation du carbone à la formation des lipides

2.1.1 – L'import du carbone inorganique et sa concentration dans la cellule

Pour réaliser la photosynthèse, les diatomées doivent prélever du carbone inorganique dans leur milieu. Le carbone inorganique dissous (DIC, *Dissolved Inorganic Carbon*) dans la mer provient essentiellement du CO_2 atmosphérique. Le DIC peut alors prendre 4 formes suivant les conditions du milieu : dioxyde de carbone (CO_2), acide carbonique (H_2CO_3), ion hydrogénocarbonate (HCO_3^-) et ion carbonate (CO_3^{2-}). Le pH moyen de l'eau de mer étant de 8, la forme majoritaire de DIC que l'on y trouve est le HCO_3^- , 180 fois plus abondants que le CO_2 (Sayanova et al., 2017).

Or, c'est le CO_2 qui est utilisé par la Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase Oxygénase (RubisCO), enzyme de fixation du carbone dans la photosynthèse. De plus, cette enzyme peut fonctionner comme carboxylase (consommation de CO_2) mais aussi comme oxygénase (consommation d' O_2). La saturation du site catalytique par du CO_2 permet d'éviter la fonction oxygénase et favorise la production de biomasse. Pour cela, il faut que la concentration en CO_2 au site catalytique soit supérieure à $50 \mu\text{M}$, là où l'eau de mer en contient entre 10 et $25 \mu\text{M}$ (Hopkinson et al., 2016). De nombreuses microalgues, dont les diatomées, ont ainsi des

mécanismes de concentration du carbone (CCM, *Carbon Concentration Mechanism*) qui permettent cette saturation.

Deux types de CCM existent chez les diatomées, le CCM biophysique et le CCM biochimique. Le premier repose sur des enzymes nommées anhydrases carboniques (AC) qui convertissent les ions HCO_3^- en CO_2 (**Figure 13A**). Il existe des AC présentant différentes localisations. Les AC extracellulaires convertissent le HCO_3^- en CO_2 au voisinage de la cellule. Les AC intracellulaires fonctionnent suite à l'action de transporteurs de bicarbonate dont les transporteurs Solute Carrier 4 récemment caractérisés, qui permettent un import à travers la membrane plasmique (Nawaly et al., 2023). L'utilisation d'inhibiteurs des AC intra et extracellulaires (étozlamide) et extracellulaires (acétazolamide) a permis de déterminer que les AC extracellulaires sont peu importantes dans la consommation de DIC dans une culture de Pt1, car l'ajout d'acétazolamide n'a pas d'effet sur cette consommation, tandis que les AC intracellulaires sont essentielles, vu que l'ajout d'étozlamide inhibe la consommation de DIC (Mus et al., 2013).

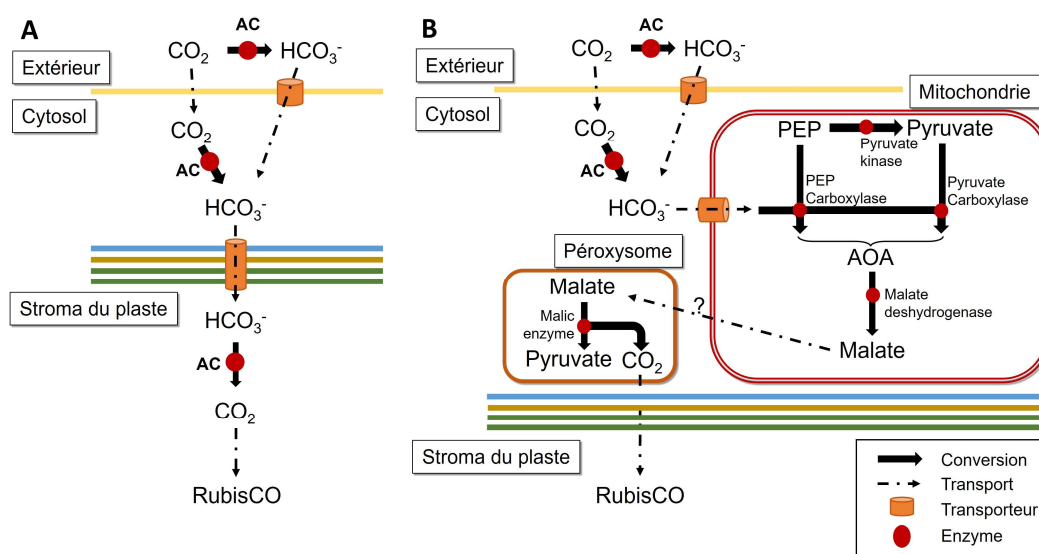


Figure 13 : Les deux types de mécanismes de concentration du carbone (CCM) présents chez les diatomées. A : Le CCM biophysique ; B : Le CCM biochimique (l'hypothèse d'une localisation de l'enzyme malique dans le peroxysoxe est représentée ici). AC : Anhydrase Carbonique, AOA : Acide Oxaloacétique, PEP : Phosphoénolpyruvate.

Le second type de CCM repose sur une voie métabolique où le CO_2 est d'abord fixé à un composé à 3 carbones (C3) ce qui forme un composé à 4 carbones (C4), qui est dégradé au niveau de la RubisCO pour libérer le CO_2 (**Figure 13B**). Une proposition de CCM biochimique a été décrite à partir d'une analyse transcriptomique, dans une expérience où le DIC

extracellulaire était à une concentration faible (Valenzuela et al., 2012). L'étape initiale proposée est une conversion du phosphoénolpyruvate (PEP) (C3) en pyruvate (C3) par une pyruvate kinase mitochondriale, suivie d'une carboxylation en acide oxaloacétique (AOA, C4) via le transfert d'un ion HCO_3^- par une pyruvate carboxylase. L'AOA est converti en malate (C4) par la malate déshydrogénase (MDH). Le malate est alors clivé en pyruvate par une enzyme malique (ME, *Malic Enzyme*), ce qui libère du CO_2 . Cette dernière étape se ferait dans les péroxysomes ou à proximité de la RubisCO, bien que la localisation prédite *in silico* des deux ME de *P. tricornutum* soit la mitochondrie. Il est toutefois possible que l'une des deux soit présente dans le péroxysome, car elle possède en c-terminal un signal proche du signal d'adressage vers cet organite. Une pyruvate phosphate dikinase permettrait le retour du pyruvate à la mitochondrie (Valenzuela et al., 2012). L'existence de ce CCM biochimique est discutée chez *P. tricornutum*, car d'autres expériences ont montré que l'inactivation d'une des enzymes essentielles à son fonctionnement, la pyruvate phosphate dikinase, n'altérerait pas le CCM total de la cellule, suggérant un rôle mineur à ce type de CCM devant le CCM biophysique (Haimovich-Dayana et al., 2013). Toutefois, le CCM biochimique pourrait n'être actif que dans certaines conditions, car une autre expérience a récemment montré, par inactivation et sur-expression, que la pyruvate phosphate dikinase participait à l'adaptation des cellules à une forte présence de DIC, notamment dans la régulation du pH cellulaire (Huang et al., 2023a). Enfin, le CCM biochimique pourrait correspondre à plusieurs voies, car une autre expérience a démontré qu'une PEP carboxylase mitochondriale pouvait produire directement de l'AOA à partir de PEP en incorporant un ion HCO_3^- , sans passer par le pyruvate (Yu et al., 2022).

2.1.2 – La photosynthèse

Le CO_2 importé est ensuite fixé par la photosynthèse oxygénique. Ce processus se déroule en deux phases dans deux sous-compartiments du plaste.

La phase claire de la photosynthèse se déroule au niveau de la membrane des thylakoïdes et nécessite de la lumière comme source d'énergie. Elle consiste en une chaîne de transfert d'électrons entre plusieurs complexes protéiques. Chez les diatomées, cet appareil photosynthétique est globalement similaire à celui des plantes (**Figure 14**) (Scarsini et al., 2019).

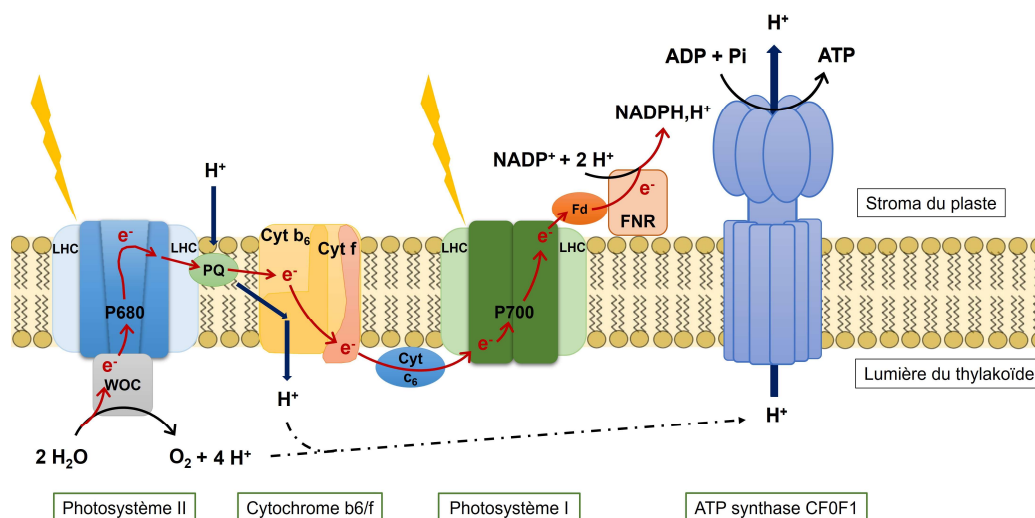


Figure 14 : La chaîne de transfert d'électrons des diatomées. *Cyt* : Cytochrome, *Fd* : Ferredoxine, *FNR* : Ferredoxin-NADP⁺ Reductase, *LHC* : Light Harvesting Complex, *PQ* : Plastoquinone, *WOC* : Water Oxidizing Complex.

L'énergie lumineuse est d'abord captée au niveau de l'antenne collectrice (*LHC*, *Light Harvesting Complex*) du photosystème II (*PSII*). Le *LHC* est constitué de protéines associées aux pigments photosynthétiques, les *fucoxanthin/chlorophyll binding proteins* (*FCP*) dont le gène est présent en de nombreux exemplaires chez *P. tricornutum*. Les pigments transfèrent ensuite l'énergie collectée vers le centre réactionnel du *PSII* jusqu'à la "paire spéciale" de chlorophylles *a* (la *P680*). Une des deux molécules de la paire est excitée ce qui conduit à la perte d'un électron qui est transféré à une plastoquinone. Celle-ci le transfère au cytochrome *b₆f*, d'où il est transféré au photosystème I (*PSI*) par le cytochrome *c₆*. La captation de lumière au niveau de son *LHC* et l'électron transféré, permettent l'excitation de la "paire spéciale" du *PSI* (*P700*) qui cède un électron à la ferredoxine qui le cède enfin à la ferredoxine-NADP⁺ oxydoréductase qui réduit le NADP⁺ en NADPH, H⁺. En parallèle, les différents transferts d'électrons se font en établissant un gradient de protons H⁺ entre le stroma du plaste et la lumière des thylakoïdes, gradient qui est utilisé par l'ATP-synthase *CF0F1* pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de Phosphate inorganique. L'électron manquant dans la *P680* est remplacé par des électrons issus de l'oxydation de l'eau au niveau du *PSII*, dans le complexe d'oxydation de l'eau (*Water Oxidizing Complex*) qui libère du dioxygène.

L'ATP et le NADPH, H⁺ sont utilisés dans le stroma du plaste pour la phase sombre de la photosynthèse : le cycle de Calvin-Benson-Bassham. La RubisCO fixe le CO₂ au Ribulose 1,5 bisphosphate (C5) ce qui produit des trioses phosphate (C3) dont une partie sert à régénérer le ribulose 1,5 bisphosphate, et l'autre sort du cycle et sert au métabolisme de la cellule. Une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate (GA3P) produite sur 6 sort ainsi du cycle.

Les réactions biochimiques qui régissent ce cycle nécessitent une proportion de 1,5 ATP pour 1 NADPH,H⁺. Cependant, la chaîne linéaire de transfert d'électrons décrite ci-dessus ne produit que 1,28 ATP pour 1 NADPH,H⁺ (Van Tol and Armbrust, 2021). Les diatomées ont donc mis en place divers mécanismes pour combler le déficit d'ATP par rapport au pouvoir réducteur, en produisant de l'ATP sans générer de NADPH,H⁺ ou bien en consommant ce dernier (**Figure 15**).

Chez les plantes et les algues vertes, ces mécanismes sont les cycles eau-eau (*water to water cycles*) qui incluent la photorespiration, la chlororespiration et les réactions de Mehler ; et le transfert cyclique d'électrons autour du PSI qui augmente le gradient de H⁺ (donc la production d'ATP) à travers la membrane des thylakoïdes sans produire de pouvoir réducteur. Bien qu'elles existent chez les diatomées, ces voies semblent minoritaires, le transfert cyclique ne comptant que pour 5% du total des électrons et les cycles eau-eau pour environ 10% (Bailleul et al., 2015). Une autre voie de consommation de pouvoir réducteur en trop est la réduction des nitrates et des sulfates (Frada et al., 2013), la réduction des sulfates pouvant prendre le pas lors d'une carence en azote, au moins chez la diatomée centrique *T. pseudonana* (Van Tol and Armbrust, 2021). La production de biomasse réduite, par la synthèse d'acides gras par exemple, semble être un autre levier de consommation du pouvoir réducteur en excès (Van Tol and Armbrust, 2021).

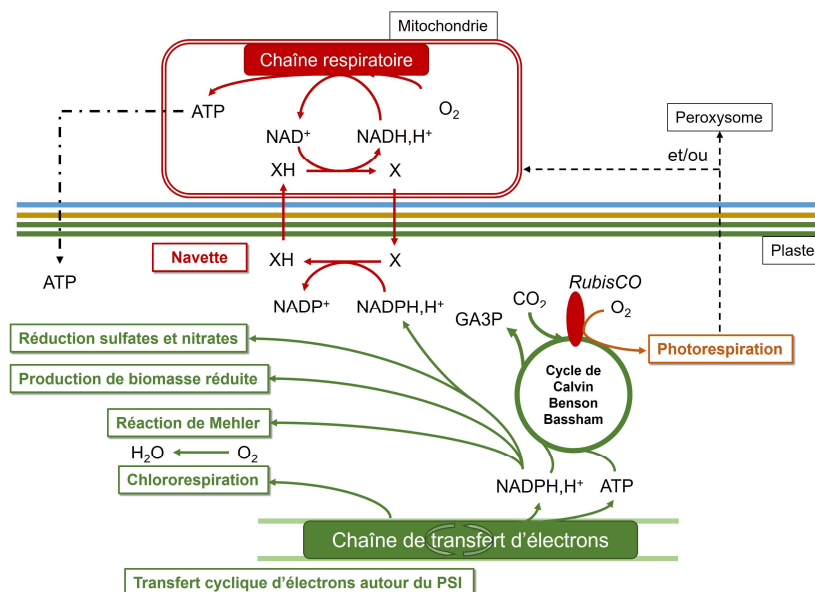


Figure 15 : La phase sombre de la photosynthèse et les mécanismes de régulation du pouvoir réducteur en excès. GA3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate, RubisCO : Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Oxygénase.

En plus de ces mécanismes, il semble que chez les diatomées, le principal mécanisme équilibrant les rapports ATP/NADPH,H⁺ soit un couplage énergétique entre la mitochondrie et

le plaste. La respiration consomme le pouvoir réducteur en excès, ce qui produit de l'ATP qui est transféré vers le plaste (Bailleul et al., 2015) (**Figure 15**).

Le mécanisme de transfert du pouvoir réducteur n'est toutefois pas identifié, et implique le passage des 4 membranes du plaste dans les deux sens. Cependant, la mitochondrie et le plaste de *P. tricornutum* sont associés étroitement (Flori et al., 2017; Uwizeye et al., 2021), facilitant la mise en place de navettes possibles comme la navette malate (*Malate Shuttle* ou *Malate Shunt*) existant chez les plantes (Kinoshita et al., 2011; Bailleul et al., 2015). Des modèles métaboliques à l'échelle du génome, établis en intégrant un maximum de compartiments, de métabolites détectés, de gènes et de réactions possibles, prédisent la possibilité d'une navette glutamine-ornithine (Levering et al., 2016) ou 2-oxoglutarate/oxaloacétate (Broddrick et al., 2019). Dans tous les cas, le NADPH, H⁺ en excès est consommé dans le plaste ce qui permet de convertir une molécule X en une autre molécule « navette » XH. Cette dernière est exportée et transférée vers la mitochondrie où elle est reconvertie en la molécule d'origine (X) ce qui permet de produire du NADH, H⁺ à partir de NAD⁺. La molécule initiale retourne ensuite au plaste (**Figure 15**).

2.1.3 – Le devenir du glycéraldéhyde-3-phosphate

Les GA3P formés par photosynthèse sont utilisés pour la biosynthèse de toutes les molécules organiques de la cellule. Par l'action des enzymes responsables de la glycolyse, présentes à la fois dans le cytosol, le plaste et la mitochondrie, les GA3P sont notamment convertis en pyruvate. Une enzyme clé dans la glycolyse est la GA3P déshydrogénase qui produit du glycérol-3-phosphate à partir de trioses phosphate. La sur-expression de cette enzyme (Phatr3_J8975) chez *P. tricornutum* conduit à une augmentation du *pool* de glycérol, une doublement du taux de LN et un profil en acides gras enrichi en SFAs et MUFAs et appauvri en PUFAs par rapport à la souche sauvage (*wt*, *wild-type*) (Yao et al., 2014).

Le pyruvate est un carrefour entre de nombreuses voies métaboliques dont la glycolyse, le cycle de Krebs, la synthèse de sucres, la synthèse des acides gras, la voie du shikimate et la synthèse des acides aminés (Heydarizadeh et al., 2019). Les enzymes impliquées dans sa transformation sont nommées « carrefour du pyruvate » (*pyruvate hub*), et permettent les interconversions entre le pyruvate et le phosphoénolpyruvate (PEP), l'acide oxaloacétique (AOA) et le malate. Ces interconversions sont à l'origine du CCM biochimique supposé de *P. tricornutum* (**Figure 13**). Par ailleurs, le pyruvate est également à la base de la synthèse des acides gras.

2.2 – La synthèse des lipides

2.2.1 – La synthèse des acides gras saturés

Comme chez les plantes, la biosynthèse des acides gras chez les diatomées se déroule majoritairement dans le plaste (**Figure 16**). Le pyruvate y est converti en acétyl-Coenzyme A (CoA) par l'action d'un Complexe Pyruvate Déshydrogénase (PDC, *Pyruvate Dehydrogenase Complex*). L'activité de ce complexe est régulée à la baisse par la pyruvate déshydrogénase kinase (Phatr3_J50961), dont le *knockdown* provoque une accumulation de lipides neutres dans la cellule (Ma et al., 2014). Le pool de pyruvate chloroplastique semble être un facteur de régulation important pour la synthèse des acides gras. La sur-expression d'un transporteur putatif de pyruvate (Phatr3_J3046), localisé dans la membrane du plaste de *P. tricornutum*, provoque une augmentation des lipides tout en augmentant le taux de croissance de la culture (Seo et al., 2020). D'autres enzymes régulant la production de pyruvate ont produit des résultats similaires. Deux ME (Phatr3_J51970, Phatr3_J54082) existent chez *P. tricornutum*, localisées dans la mitochondrie où elles convertissent le malate, intermédiaire du cycle de Krebs, en pyruvate tout en produisant des équivalents réducteurs nécessaires à la biosynthèse des acides gras et leur désaturation. Leur sur-expression conduit à une accumulation de lipides neutres dans les cellules, supposant un export (non caractérisé) du pyruvate et du pouvoir réducteur vers le plaste (Xue et al., 2015; Zhu et al., 2018; Zhang et al., 2021b). Ces résultats suggèrent un rôle central du carrefour du pyruvate dans la régulation en amont de la biosynthèse des lipides.

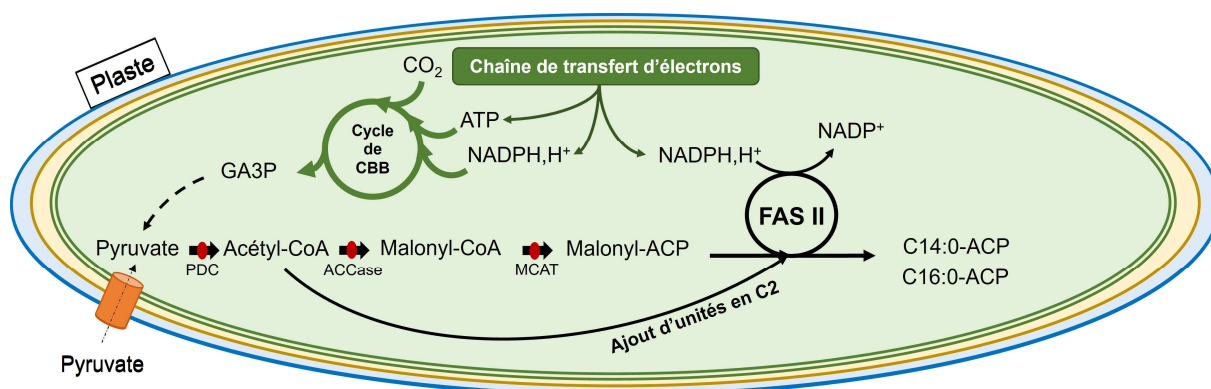


Figure 16 : Les étapes de la synthèse des acides gras chez les diatomées. ACP : Acyl Carrier Protein, CBB : Calvin Benson Bassham, CoA : Coenzyme A, FAS : Fatty Acid Synthase, GA3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate, MCAT : Malonyl-CoA:ACP Transacylase, PDC : Pyruvate Dehydrogenase Complex.

L'acétyl-CoA est converti en malonyl-CoA par l'action de l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACCase). Cette étape est considérée comme la première étape de la synthèse des lipides proprement

dite et a donc été ciblée par des études de sur-expression dans le but d'augmenter la production de lipides. Là où la création de lignées des diatomées *Cyclotella cryptica* et *Navicula saprophila* sur-exprimant l'ACCCase n'a donné aucune accumulation de lipides malgré une multiplication de l'expression du gène par 2 à 3 (Sheehan et al., 1998), l'expression d'une sous-unité de l'ACCCase plastidiale (Phatr3_EG01955) de *P. tricornutum* chez *Escherichia coli* a doublé la concentration en lipides neutres par rapport à la souche *wt*, et augmenté la proportion de MUFAs (Xie et al., 2013).

Le malonyl-CoA est converti en malonyl-ACP (*Acyl Carrier Protein*) par une Malonyl-CoA:ACP Transacylase (MCAT). Ce malonyl-ACP est le substrat du complexe Acide Gras Synthase de type II (FASII), que l'on trouve chez les diatomées (Ryall et al., 2003). Ce complexe formé de 4 enzymes dissociées permet d'allonger la chaîne carbonée du malonyl-CoA en greffant 2 carbones issus d'un autre acétyl-CoA. La nouvelle molécule est ensuite allongée de 2 carbones en 2 carbones par les enzymes du FASII en consommant à chaque "tour" du NADPH, H⁺, jusqu'à obtenir des acides gras saturés à 14 ou 16 carbones liés à une ACP (Zulu et al., 2018; Li-Beisson et al., 2019) (**Figure 16**).

2.2.2 – La synthèse des acides gras insaturés

Les acides gras liés à une ACP peuvent ensuite avoir deux destinations. D'abord, ils peuvent être désaturés dans le plaste. Une $\Delta 9$ acyl-ACP désaturase (Phatr3_J9316) de *P. tricornutum* a été récemment caractérisée par deux équipes (Liu et al., 2020; Smith et al., 2021). Le C16:0 est ainsi converti dans le plaste en C16:1 n-7 puis suit une série de désaturations qui donnent du C16:2 n-4 ($\Delta 12$ désaturase, Phatr3_J48423), du C16:3 n-4 ($\Delta 6$ désaturase, Phatr3_J50443) et éventuellement du C16:4 n-1 ($\omega 3$ désaturase, Phatr3_41570) (Domergue et al., 2003; Dolch and Maréchal, 2015). On retrouve ces chaînes d'acides gras dans les lipides de membrane du plaste (**Figure 17**).

Les acyl-ACP peuvent également être exportés dans le cytosol. Ils sont d'abord séparés de l'ACP par une thioestérase. Deux thioestérases (Phatr3_J10454 et Phatr3_J33198) ont été prédites puis fonctionnellement caractérisées chez *P. tricornutum* (Gong et al., 2011; Hao et al., 2018). Elles ont la particularité de présenter très peu d'homologie avec les thioestérases de plantes et de bactéries connues jusque-là. La seconde a été localisée expérimentalement dans le plaste et montre *in vitro* une activité acyl-CoA thioestérase, les auteurs n'ayant pas testé son activité sur les acyl-ACP (Hao et al., 2018).

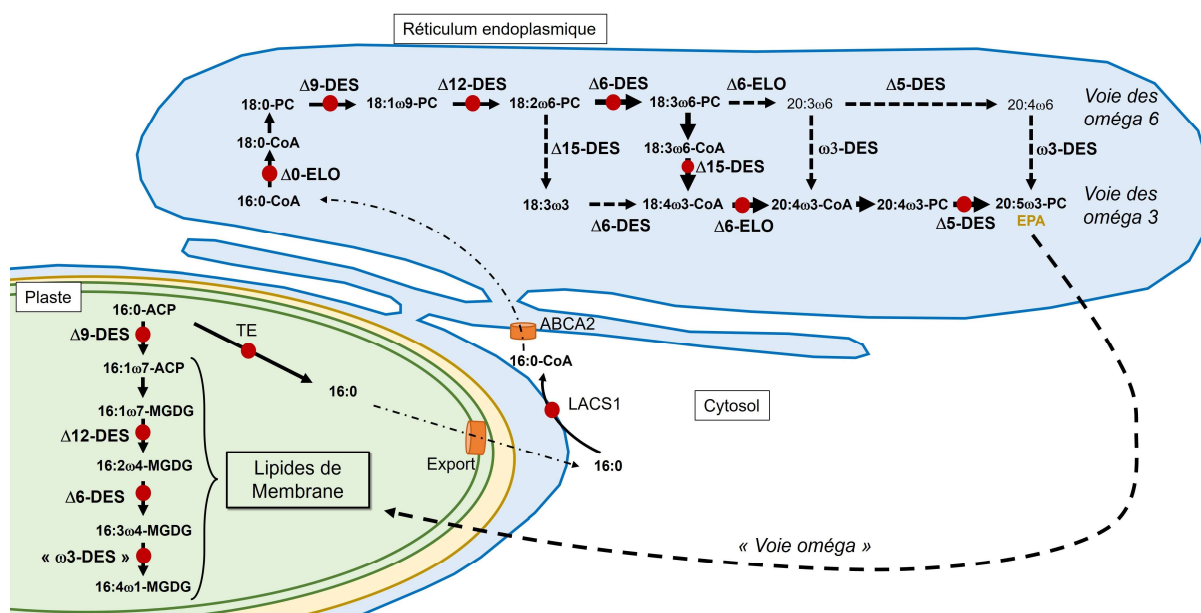


Figure 17 : Le devenir des acides gras incluant transports, élongations et désaturations.

Dans les voies d'élongation-désaturation du RE, les flèches pleines indiquent la voie majoritaire mise en évidence par Arao et Yamada (1994). ABCA2 : Transporteur ABC de classe A2, DES : Désaturase, ELO : Élongase, EPA : Acide Eicosapentaénoïque, TE : Thioestérase.

Une fois libérés, les AGL sont exportés du plaste par des mécanismes non identifiés chez les straménopiles. Chez les plantes, il est réalisé par une unique protéine FAX1 (*Fatty Acid Export*) insérée dans la membrane interne du plaste (Li et al., 2015). Deux homologues de FAX1 ont été caractérisés chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* où ils ont une fonction d'exportation des acides gras et où leur sur-expression provoque une augmentation des taux de TG (Li et al., 2019). Aucun homologue des protéines FAX n'a été à ce jour identifié chez les straménopiles, la question du mécanisme permettant le passage des membranes du plaste reste donc non élucidée à ce jour.

Le passage de la seconde membrane du plaste se fait ensuite selon des mécanismes inconnus à ce jour chez les plantes, et donc de fait chez les microalgues possédant un plaste complexe. L'essentiel de la suite des réactions d'élongation et de désaturation des acides gras se produit dans le RE. Comme chez les endosymbiotes secondaires, la membrane la plus externe du plaste est continue avec le RE, les acides gras pourraient être exportés directement dans le RE après 3 passages de membranes depuis le stroma du plaste. Toutefois par analogie avec les autres organismes photosynthétiques, il est généralement supposé que les acides gras passent d'abord par le cytosol avant d'entrer dans le RE. C'est donc cette seconde hypothèse qui est décrite ici.

Une fois dans le cytosol, les AGL sont convertis en acyl-CoA par l'action d'une synthétase d'acyl-CoA à longue chaîne (LACS, *Long-chain Acyl-CoA Synthetase*) dont 5 ont été décrites chez *P. tricornutum* (Dans l'ordre de 1 à 5 : Phatr3_J20143, Phatr3_J12420, Phatr3_J54151, Phatr3_J45510, Phatr3_J17720) (Guo et al., 2014). Ces LACS1 à 5 présentent peu d'homologie avec les LACS déjà connues chez d'autres organismes, bien que la LACS5 (parfois nommée ACL, Acyl-CoA Ligase) se rapproche d'enzymes trouvées chez les animaux. Chacune de ces enzymes a été clonée et sur-exprimée dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* YB525, déficiente pour la fonction de synthèse des acyl-CoA, qui permet à la cellule d'importer des acides gras exogènes pour se nourrir. Seules les LACS1 et 4 sont capables de compléter le phénotype déficient de la levure, mais également d'augmenter sa synthèse de TG (Guo et al., 2014). Récemment, les 5 gènes de LACS ont été caractérisés (Hao et al., 2022). Les activités enzymatiques *in vitro* sur certains acides gras endogènes de *P. tricornutum* ont été déterminées, ainsi que leurs localisations subcellulaires (**Tableau II**). Des mutants KO pour chacune de ces enzymes ont été générés et les résultats suggèrent que LACS1 en particulier pourrait avoir un rôle dans le remodelage des lipides de membrane pendant une carence en azote. Comme elle est localisée dans la cERM et qu'elle restaure l'importation d'acides gras chez la levure déficiente (Guo et al., 2014), elle pourrait être impliquée dans l'export des acides gras depuis le plaste vers le cytosol (Hao et al., 2022).

Tableau II : Récapitulatif des principales propriétés des LACS (Données Guo et al. 2014 et Hao et al. 2022). Localisation déterminée par fusion avec la GFP. La colonne « Restaure » indique si l'expression de cette enzyme dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* YB525 restaure l'activité d'import des acides gras. Les colonnes « AG préférés » et « Sans activité » indiquent les préférences de substrat (acides gras) de ces enzymes.

Enzyme	ID	Localisation	Restaure	AG préférés ^a	Sans activité ^a
LACS1	Phatr3_J20143	cERM	Oui	EPA, 18:1	
LACS2	Phatr3_J12420	Cytosol	Non	16:0, 18:0	
LACS3	Phatr3_J54151	Mitochondrie	Non	18:1, EPA	14:0, 16:0, 18:0
LACS4	Phatr3_J45510	Cytosol	Oui	EPA, 18:1	14:0, 16:0
LACS5	Phatr3_J17720	Peroxisome	Non	18:0, 18:1	EPA

^a Acides gras testés : C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, EPA

Les acyl-CoA ainsi produits rejoignent un pool cytosolique d'où ils peuvent ensuite être exportés vers le RE. Dans ce dernier, les acyl-CoA sont directement incorporés à des lipides synthétisés sur place, ou bien ils subissent des réactions d'élongation et de désaturation pour donner des PUFAs à longue et très longue chaîne. L'export vers le RE n'est pas caractérisé

chez les diatomées, mais par analogie avec l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, il pourrait être assuré par un transporteur ABCA2 (Jang et al., 2020), dont une recherche par BLAST identifie au moins 2 homologues chez *P. tricornutum* (Phatr3_J23497 et Phatr3_J39708).

Les élongations et désaturations dans le RE (**Figure 17**) commencent par une première étape d'élongation du C16:0 en C18:0 par l'action d'un complexe enzymatique d'élongation. L'élongation suit un mécanisme similaire à la synthèse des acides gras, avec quatre étapes enzymatiques qui ajoutent 2 carbones à la chaîne aliphatique. Parmi ces 4 étapes, la première est catalysée par une β -céto-acyl-CoA synthase, aussi désignée sous le terme d'élongase. Chez *Microchloropsis (Nannochloropsis) gaditana*, une $\Delta 0$ -élongase catalysant le passage du C16:0 au C18:0 a été caractérisée, et il en existe deux homologues chez *P. tricornutum* (Phatr3_J16376 et Phatr3_J49867) qui pourraient assurer la même fonction (Dolch et al., 2017b).

Des expériences de marquage au carbone 14 ont permis de déterminer les voies métaboliques qu'emprunte ensuite le C18:0 jusqu'à la synthèse de l'EPA (Arao and Yamada, 1994). Plusieurs voies ont été identifiées, mais la principale produit des intermédiaires aussi bien dans la voie dite des oméga 6 que dans celle des oméga 3 (**Figure 17**). Dans cette voie mixte, l'activité d'une $\Delta 9$ -désaturase (Phatr3_J28797) catalyse la formation de C18:1 n-9 ensuite converti en C18:2 n-6 par une $\Delta 12$ -désaturase (Phatr3_J25769). Ce C18:2 n-6 est converti en C18:3 n-6 par une $\Delta 6$ -désaturase (Phatr3_J29488), puis en C18:4 n-3 par une $\Delta 15$ -désaturase (non identifiée). Une élongation (impliquant une $\Delta 6$ -élongase, Phatr3_J20508 ou Phatr3_J22274) et une désaturation ($\Delta 5$ -désaturase, Phatr3_J46830 ou Phatr3_J22459) aboutissent à l'EPA, PUFA majoritaire de *P. tricornutum* (Arao et al., 1994; Dolch and Maréchal, 2015; Smith et al., 2021).

Les différentes désaturases et élongases n'ont pas les mêmes substrats : les élongases agissent sur des acyl-CoA libres, tandis que les désaturases admettent comme substrats des chaînes d'acides gras reliées à de la PC (Arao et al., 1994) du PE ou du DGTA (Dolch and Maréchal, 2015). L'EPA étant majoritaire dans les glycolipides (GL), cet acide gras est ensuite transféré vers le plaste par une voie inconnue désignée par le terme "voie oméga" (Petroutsos et al., 2014). Une étude récente a montré que la production d'EPA est régulée très en amont, au moment du "choix" entre l'export et la désaturation du C16:0 en C16:1 n-7, par l'activité de l'acyl-ACP $\Delta 9$ -désaturase plastidiale (Smith et al., 2021).

2.2.3 – La synthèse des glycérolipides

2.2.3.1 – La voie de Kennedy

Que ce soit dans le plaste ou dans le RE, les acyl-CoA peuvent entrer dans la voie de synthèse des glycérolipides, la voie de Kennedy, qui suit les mêmes réactions dans les deux compartiments (Kennedy, 1956; Weiss et al., 1960) (**Figure 18**). On parle de voie procaryote dans le plaste et de voie eucaryote dans le RE.

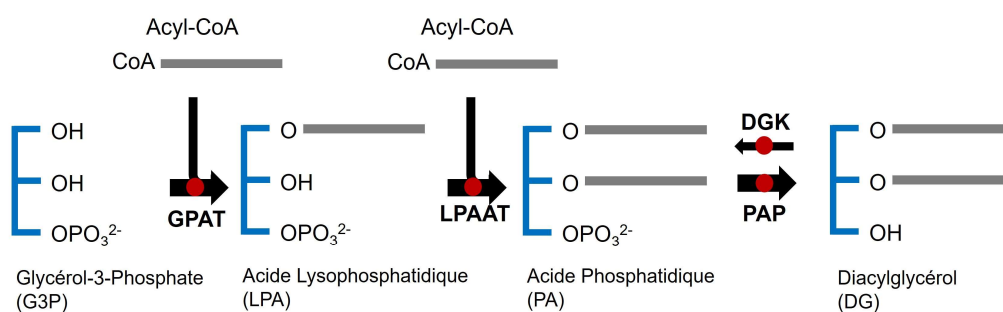


Figure 18 : La synthèse des DG par la voie de Kennedy. Dans le plaste, les chaînes acyl ajoutées à chaque étape sont liées à des ACP et non des CoA. DGK : Diacylglycerol Kinase, GPAT : Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, LPAAT : Lysophosphatidic Acid Acyltransferase, PAP : Phosphatidic Acid Phosphatase.

1 – Comme première étape, une Glycérol-3-Phosphate Acyltransférase (GPAT) estérifie un acide gras sur un glycérol-3-phosphate ce qui donne un LPA. La sur-expression d'une GPAT (Phatr3_EG02461) de *P. tricornutum* a conduit à une augmentation de la teneur en lipides neutres ainsi que de l'importance relative des acides gras insaturés (Niu et al., 2016). Une autre GPAT (Phatr3_J3262) a été identifiée et sur-exprimée, conduisant à une diminution des contenus en protéines et glucides et à une augmentation des lipides après 7 jours de culture, par rapport à la souche sauvage. Le profil d'acides gras a également été altéré, favorisant le C16:0 au détriment des espèces en C18 (Wang et al., 2020).

2 – Le LPA obtenu reçoit une seconde chaîne d'acide gras par l'activité de l'Acide Lysophosphatidique Acyltransférase (LPAAT, *Lysophosphatidic Acid Acyltransferase*) ce qui donne un PA. Il existe de nombreuses LPAAT annotées dans le génome de *P. tricornutum* (Phatr3_J11916, Phatr3_J20460, Phatr3_J43099, Phatr3_J45551, Phatr3_J48640). La sur-expression de l'un de ces gènes (Phatr3_J43099) chez *P. tricornutum* conduit à une augmentation des lipides au détriment des glucides et des protéines, sans pour autant diminuer la croissance. Cette sur-expression conduit aussi à une augmentation de l'expression d'autres gènes impliqués dans la voie de Kennedy, ce qui "tire" le carbone vers la production de TG. Le profil d'acides gras est enrichi en C16:0 et en PUFAs au détriment des MUFAs. Des observations au microscope électronique ont permis de localiser la protéine dans la membrane

du plaste et d'observer la présence de plastoglobules à l'intérieur de ce dernier, des sous-compartiments du plaste stockant des TG (Balamurugan et al., 2017). Une autre LPAAT (Phatr3_J45551) a été sur-exprimée et sous-exprimée (KD) par construction antisens, la sur-expression augmentant l'accumulation de lipides en phase exponentielle comme en phase stationnaire de croissance, et altérant le profil d'acides gras. Le mutant KD montre des effets opposés (Li et al., 2020). Une GPAT (Phatr3_EG02461) et une LPAAT (Phatr3_J43099) plastidiales ont aussi été sur-exprimées de manière conjointe (Wang et al., 2018). La souche transformée a de meilleures performances photosynthétiques et un taux de chlorophylle augmenté par rapport au *wt*, possiblement par l'induction de la synthèse de glycolipides. Les lignées transformées ont des contenus en lipides totaux et en LN augmentés au détriment des glucides et des protéines, ainsi qu'un diamètre des LD plus important (Wang et al., 2018). Récemment les propriétés biochimiques d'une autre LPAAT (Phatr3_J20460) ont été déterminées (Połońska et al., 2021), démontrant que cette enzyme est capable d'estérifier des acyl-CoA à chaîne insaturée, notamment du C20:4 n-3 précurseur de l'EPA, sur des LPC ou d'autres acides lysophosphatidiques. Une étude de génomique fonctionnelle de cette même enzyme a également été conduite (You et al., 2023) démontrant qu'elle était localisée dans la membrane la plus externe du plaste (cERM) et que son inactivation diminuait à la fois la croissance cellulaire, l'accumulation de TG ainsi que la proportion d'EPA dans les lipides plastidiaux de la souche mutante. Cette enzyme a donc probablement un rôle important dans la synthèse des glycérolipides.

3 – Le PA porte un groupement phosphate en position *sn*-3 qui peut être libéré par l'action d'une *Phosphatidic Acid Phosphatase* (PAP) (Phatr3_32083, Phatr3_J39949, Phatr3_J40261, Phatr3_J45366) pour donner un DG. Cette réaction est réversible par l'action d'une DG kinase (Phatr3_J14202) (**Figure 18**).

2.2.3.2 – La synthèse des lipides polaires

Les DG et PA produits lors de la dernière étape de la voie de Kennedy sont des intermédiaires métaboliques entre la plupart des glycérolipides de la cellule, qu'ils soient produits dans le plaste ou dans le RE (**Figure 19**).

Dans le plaste, l'action d'une MGDG Synthase (Phatr3_J14125, Phatr3_J54168 ou Phatr3_J9619) vient greffer un galactose au DG, ce qui forme du MGDG, qui peut lui-même recevoir un galactose par l'action de la DGDG synthase (Phatr3_J12884, Phatr3_J2215) pour donner du DGDG. L'action de la SQDG synthase (Phatr3_J22554, Phatr3_J50356, Phatr3_J54068, Phatr3_EG02454) greffe sur le DG un sulfoquinovosyl, ce qui donne du SQDG. La cytosyl-diphosphate diacylglycerol synthase (Phatr3_J47250, Phatr3_J54756, Phatr3_J7678, Phatr3_Jdraft559) peut remplacer le groupement phosphate d'un PA par une

Citidine Diphosphate (CDP). Le CDP-DG ainsi obtenu sert de précurseur à la synthèse de la PG suite aux actions successives de la PG phosphate synthase (Phatr3_J8663 ou Phatr3_J47576) et de la PG phosphatase (Phatr3_J39949) (Li-Beisson et al., 2019).

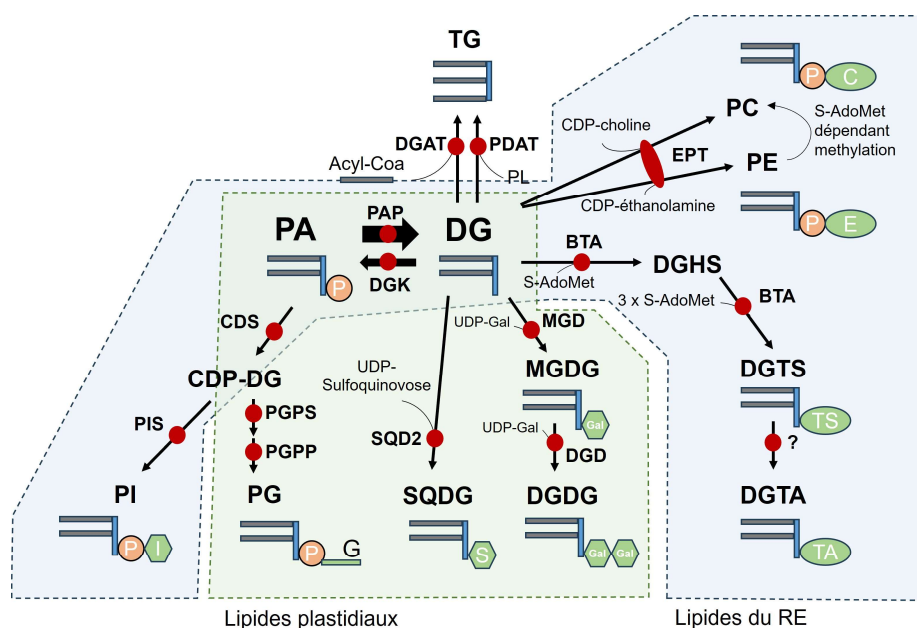


Figure 19 : Diacylgcérol et Acide Phosphatidique, carrefours métaboliques dans la synthèse des glycérolipides.

BTA : Bétaïne Lipide Synthase, CDS : Cytidine Diphosphate Diacylgcérol Synthase, CDP-DG : Cytidine Diphosphate Diacylgcérol, DG : Diacylgcérol, DGAT : Diacylgcérol Acyltransférase, DGDG : Digalctosyl Diacylgcérol, DGHS : Diacylgcérol Homosérine, DGK : Diacylgcérol Kinase, DGTA : Diacylgcérol Hydroxyméthyltriméthyl- β -alanine, DGTS : Diacylgcérol Triméthylhomosérine, EPT : Ethanolamine Phosphotransférase, MGD : Monogalctosyl Diacylgcérol Synthase, MGDG : Monogalctosyl Diacylgcérol, PA : Acide Phosphatidique, PAP : Phosphatidic Acid Phosphatase, PC : Phosphatidylcholine, PE : Phosphatidyléthanolamine, PG : Phosphatidylglycérol, PGPP : Phosphatidylglycérol Phosphate Phosphatase, PGPS : Phosphatidylglycérol Phosphate Synthase, PI : Phosphatidylinositol, PIS : Phosphatidylinositol Synthase, PL : Phospholipide, S-AdoMet : S-Adénosylméthionine, SQDG : Sulfoquinovosyl Diacylgcérol, SQD2 : Sulfoquinovosyl Diacylgcérol Synthase.

Dans le RE, la bétaïne lipide synthase (Phatr3_J42872) utilise 4 molécules de S-Adénosylméthionine (S-AdoMet) pour former du DGTS à partir de DG. Le DGTS serait ensuite converti en DGTA selon un mécanisme inconnu. L'action de l'amino-alcool phosphotransférase peut produire de la PC ou de la PE suivant la chaîne transférée. La PE peut être convertie en PC par une méthylation S-AdoMet dépendante. Le PA peut aussi être converti en CDP-DG, lui-même converti en PI par la PI Synthase (Phatr3_J43010) ou en PG suivant la même voie que dans le plaste (Li-Beisson et al., 2019).

2.2.3.3 – La synthèse des triglycérides

Si le DG n'est pas utilisé pour produire des lipides polaires, une dernière étape peut l'utiliser pour produire un TG (**Figure 20**). Cette étape peut se faire dans la voie acyl-CoA dépendante qui consiste en un transfert d'une troisième chaîne d'acide gras par l'action d'une Diacylglycérol Acyltransférase (DGAT) (**Figure 20A**). Il en existe plusieurs exemplaires chez *P. tricornutum* classés en familles. On trouve ainsi une DGAT 1, 5 DGAT 2 et une possible DGAT 3. Les DGAT 1 et 2 sont des protéines membranaires tandis que la DGAT 3 est cytosolique chez les plantes qui en possèdent (Zulu et al., 2018; Guéguen et al., 2021). Catalysant la dernière étape de la formation des TG, elles ont été caractérisées avec pour objectif l'augmentation de la production de lipides.

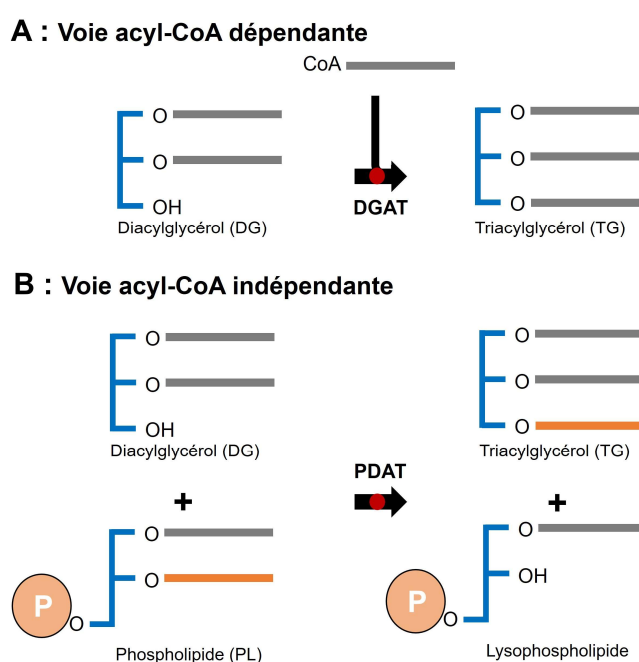


Figure 20 : Les voies de synthèse des triglycérides. A : la voie acyl-CoA dépendante. B : la voie acyl-CoA indépendante. DGAT : Diacylglycérol Acyltransférase, PDAT : Phospholipide:Diacylglycérol Acyltransférase

La DGAT 1 (Phatr3_J9794) a été caractérisée dans deux études (Guihéneuf et al., 2011; Zhang et al., 2021c), la première ayant utilisé la version incomplète du gène disponible dans l'annotation du génome de l'époque. La DGAT 1 a été sur-exprimée dans un modèle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* H1246 n'exprimant pas la biosynthèse des TG, et permet la restauration de la production de TG avec une préférence pour les SFAs (C16:0 et C18:0), et l'apparition de LD (Guihéneuf et al., 2011). La version complétée du gène a récemment été caractérisée à nouveau. Elle permet également la restauration de la synthèse des TG chez une levure déficiente mais en favorisant les MUFAs au détriment des SFAs. *In vitro*, c'est la

DGAT de *P. tricornutum* avec l'activité la plus importante, et c'est également la plus sur-régulée en situation de stress azoté. Une fois sur-exprimée de manière endogène, elle double la production de lipides par rapport au *wt* sans changer le profil d'acides gras des TG, et sans affecter la croissance (Zhang et al., 2021c).

Les DGAT 2 ont fait l'objet de nombreuses études. Elles sont désignées par les lettres de A à E. La sur-expression de la DGAT 2A (Phatr3_J49462) augmente l'efficacité photosynthétique sans différence sur le taux de croissance, la concentration en TG augmente de 35% par rapport au *wt* et la proportion en acides gras insaturés, et en particulier en EPA, augmente également (Niu et al., 2013). La DGAT 2B (Phatr3_J49544) sur-exprimée dans la levure déficiente en TG permet d'en restaurer la production. L'enzyme exprimée dans la levure *Pichia pastoris* présente une préférence pour le C18:1, le C18:2 et le C16:1 (Gong et al., 2013). Dans une autre étude, une lignée de *P. tricornutum* sur-exprimant la DGAT 2A et une autre sur-exprimant la DGAT 2B ont été créées puis caractérisées. Dans ce cas, la lignée DGAT 2A n'a pas montré de différence en TG par rapport au *wt* contrairement à la lignée DGAT 2B dont la production était supérieure au *wt*. Une caractérisation plus poussée a montré que la DGAT 2B favorisait l'inclusion de C16:0 et C16:1 n-7 dans les TG en conditions de stress azoté (Haslam et al., 2020). La DGAT 2C (Phatr3_J31662) n'est pas capable de restaurer l'activité métabolique d'une levure déficiente en TG (Gong et al., 2013). De plus, dans un travail de thèse la sur-expression de cette enzyme n'a pas altéré la composition en lipides (Bower, 2019). La DGAT 2D (Phatr3_J43469) a été sur-exprimée chez *P. tricornutum* où elle a multiplié par 2 le contenu en lipides malgré une croissance 15% plus faible que chez le *wt*. De plus, la sur-expression de la DGAT 2D induit une sous-expression de gènes de dégradation des TG (Dinamarca et al., 2017). Cependant, la sur-expression de la DGAT 2D chez la levure déficiente en TG n'a pas montré de restauration de la production (Gong et al., 2013). La DGAT 2E (Phatr_EG00369) a été sur-exprimée dans le cadre d'un travail de thèse (Bower, 2019) mais aucun effet n'a été noté sur les TG produits en carence d'azote.

La possible DGAT 3 (Phatr3_J49708) a été caractérisée deux fois à quelques années d'intervalle (Cui et al., 2013, 2018). Elle présente la particularité d'avoir également une activité enzymatique de synthèse des cérides, qui apparaissent pendant une carence en azote chez le mutant OE de *P. tricornutum* (Cui et al., 2018). Cette enzyme est également capable de restaurer une levure déficiente en TG en lui ajoutant de plus la production de cérides (Cui et al., 2013, 2018).

Une étude récente a réévalué 6 DGAT (DGAT 1, DGAT 2A à D, DGAT 3) chez *P. tricornutum* (Zhang et al., 2021c). En accord avec les résultats précédemment obtenus sur les levures H1246, seules la DGAT 1, la DGAT 2B et la DGAT 3 sont capables de restaurer la synthèse

des TG. Ce sont les 3 enzymes ayant également l'activité *in vitro* sur le C16:0-CoA, le C16:1-CoA et l'EPA-CoA les plus élevées, celles des autres DGAT2 étant très faibles. Cette étude a enfin démontré, par fusion avec la *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP), que les DGAT 1, DGAT 2B et DGAT 3 sont localisées au niveau de la quatrième membrane du plaste (cERM). On peut ainsi noter que contrairement à ses homologues de plantes, la DGAT 3 de *P. tricornutum* n'est pas cytosolique mais membranaire (Zhang et al., 2021c). Ces trois enzymes semblent assurer la synthèse des TG chez *P. tricornutum*, même s'il n'est pas exclu que les quatre autres enzymes puissent aussi être actives dans certaines conditions particulières, non encore découvertes. Ces résultats montrent qu'en plus d'assurer leur fonction dans la synthèse des TG, les différentes DGAT influent aussi sur l'expression d'autres enzymes et sur la nature des chaînes d'acides gras incorporées dans les TG.

Outre cette première voie de formation des TG, dite acyl-CoA dépendante, il existe une autre voie de synthèse possible, impliquant une molécule de DG et une molécule de PL (**Figure 20B**). La Phospholipide:Diacylglycérol Acyltransférase (PDAT) transfère alors une des chaînes du PL au DG ce qui libère un TG et un lysophospholipide. En plus des PL, il a également été montré chez *Chlamydomonas reinhardtii* que la PDAT pouvait utiliser d'autres types de lipides polaires, notamment du MGDG (Yoon et al., 2012). Deux gènes de PDAT sont présents dans le génome de *P. tricornutum* (Phatr3_J8860 et Phatr3_J49702). La première (Phatr3_J8860) a été sur-exprimée dans le cadre d'un travail de thèse (Bower, 2019). Les lignées OE obtenues produisent des TG enrichis en EPA et appauvris en C16:0, tandis que les proportions en DGTA, PC et PE diminuent relativement à ce qui se produit chez des souches OE de DGAT. La seconde PDAT (Phatr3_J49702) reste, à ce jour, non caractérisée.

2.3 – Le dégradation des lipides

Les TG synthétisés dans le RE sont stockés dans des LD jusqu'à leur dégradation par des processus qui ont été peu étudiés chez les diatomées (Kong et al., 2018; Zienkiewicz and Zienkiewicz, 2020). Les PL, BL et GL constitutifs des membranes cellulaires et du plaste peuvent aussi être remobilisés pour assurer d'autres fonctions.

2.3.1 – Les lipases et la lipolyse

2.3.1.1 – Caractéristiques générales

L'une des grandes voies de dégradation des glycérolipides est l'activité des lipases ou lipolyse. Les lipases sont des protéines appartenant à la superfamille des hydrolases à repliement α/β , caractérisées par un enchaînement de 8 feuillets β reliés entre eux par 6 hélices α (**Figure 21**).

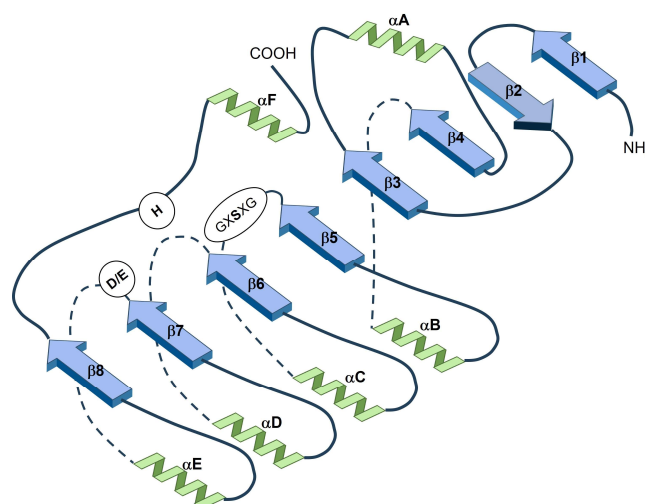


Figure 21 : Le repliement α/β des lipases montrant les positions des résidus catalytiques et du pentapeptide conservé. Les feuillets beta sont représentés en bleu, les hélices alpha en vert.

Les lipases ne sont pas les seules enzymes à présenter cette structure qu'elles partagent avec certaines peptidases, des déhalogénases, peroxydases ou époxyde hydrolases. Dans les lipases, ce repliement particulier forme un site catalytique de trois acides aminés présents sur différentes portions de la protéine : une histidine (H), une sérine (S) et un acide aminé à résidu carboxyle (acide aspartique D ou acide glutamique E). De la même façon que pour le repliement, un motif récurrent mais non exclusif, car retrouvé dans les protéases à sérine, est présent autour de la sérine du site catalytique : il s'agit du motif GX SXG où G est une glycine, S la sérine du site actif et X un autre acide aminé. Par des éléments structuraux additionnels

comme les volets (*lids*) mobiles, les lipases sont généralement des protéines agissant à une interface (Casas-Godoy et al., 2018), comme peut l'être la frontière entre LD et cytosol.

Il existe de plus des exceptions au motif GX SXG, en particulier les lipases *GDSL-like* dont le motif conservé est un enchaînement de glycine (G), d'acide aspartique (D), de sérine (S) et de Leucine (L) situé en n-terminal. Ces lipases ont une grande flexibilité de substrats, du fait notamment d'un site actif changeant de conformation à la suite de la liaison avec différents substrats. Les lipases GDSL décrites ont des activités thioestérases, lysophospholipases, protéases ou arylestérases (Akoh et al., 2004). Certaines GDSL-like lipases montrent aussi une activité TG lipase *in vitro* (Bielen et al., 2009).

Les lipases peuvent également être classées en sous-catégories suivant leur substrat et suivant la liaison qu'elles clivent. On a par exemple les phospholipases, capables de libérer les acides gras des phospholipides, et dans cette catégorie, plusieurs groupes suivant la liaison ciblée. Ainsi, les phospholipases A1 et A2 libèrent un acide gras d'un PL en clivant respectivement les positions *sn-1* et *sn-2*. Les phospholipases B clivent indifféremment en position *sn-1* ou *sn-2* et cumulent donc les activités des phospholipases A1 et A2. Les phospholipases C séparent le groupement phosphate du squelette glycérol, produisant un DG et un groupement phosphate. On en trouve deux groupes : celles qui ciblent spécifiquement des PI, et celles qui n'ont pas de spécificité. Les phospholipases D séparent le groupement phosphate de sa chaîne associée libérant un PA (Figure 22).

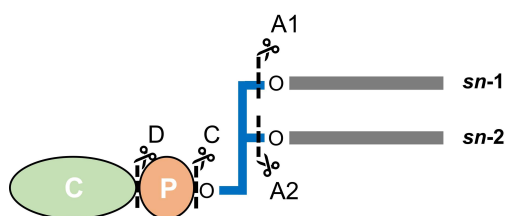


Figure 22 : Les sites d'action des différents types de phospholipases. *Le phospholipide représenté est la phosphatidylcholine.*

2.3.1.2 – Les lipases identifiées chez *Phaeodactylum tricornutum*

Chez *P. tricornutum*, trois TG lipases ont été formellement caractérisées, la OmTGL (Phatr3_J37711) qui se situe dans la PPM, troisième membrane la plus externe du plaste (Li et al., 2018), la tgl1 (Phatr3_J1971), homologue de la *Sugar-dependant lipase* (SDP1) d'*Arabidopsis*, récemment localisée dans le stroma du plaste (Barka et al., 2016; Huang et al., 2023b), et la CGI-58-like (Phatr3_J54974) (Calleja et al., 2015; Shu et al., 2023) homologue de la protéine CGI-58 humaine (*Comparative Gene Identification 58*, souvent nommée également *Alpha Beta hydrolase domain containing 5*, ABHD5). Cette protéine à repliement

α/β est décrite comme un activateur des lipases mais ses homologues chez les diatomées ont une fonction lipase (Trentacoste et al., 2013; Calleja et al., 2015).

Pour chacune de ces trois lipases, des études fonctionnelles ont été réalisées.

Pour la *tgl1*, le mutant inactivé (KD) conduit à une augmentation des TG sans affecter les taux de lipides polaires dans la cellule ni le taux de croissance (Barka et al., 2016). Un homologue de *tgl1* a été récemment caractérisé chez la diatomée *F. solaris* et son KD produit une augmentation du taux de croissance et du taux de TG dans la cellule en conditions riches en nutriments, mais seulement une légère augmentation des taux de TG pendant une carence (Maeda et al., 2021).

Pour *OmTGL*, le mutant KD conduit également à une accumulation de TG, mais en parallèle à une diminution des taux de lipides polaires, des taux de pigments et à une légère diminution du taux de croissance. Dans cette souche mutante, la proportion d'EPA dans les TG augmente. Ces résultats suggèrent, en accord avec sa localisation dans l'enveloppe du plaste, que cette lipase préfère les TG contenant de l'EPA et pourrait contribuer à fournir des précurseurs pour la synthèse des lipides de membrane plastidiaux (Li et al., 2018).

Pour la *CGI-58-like*, les mutants KD présentent une augmentation des lipides et de la croissance (Calleja et al., 2015). La protéine *CGI-58-like* a également été sur-exprimée dans une étude récente (Shu et al., 2023) et les souches mutantes OE accumulaient étonnamment une quantité plus importante de TG, ainsi qu'une proportion plus importante d'EPA dans ces TG. Les auteurs ont également déterminé que cette protéine était localisée dans la mitochondrie, ce qui a conduit à l'hypothèse que cet homologue de *CGI-58* joue un rôle dans la dégradation des lipides au niveau de la mitochondrie et dans le recyclage des chaînes d'acides gras ainsi obtenues pour former des TG (Shu et al., 2023).

En plus de ces trois enzymes, il a été rapporté que chez *P. tricornutum*, au moins 49 lipases (en excluant les *GDSL-like* lipases) étaient annotées dans le génome (Barka et al., 2016).

2.3.1.3 – Localisation et mécanismes de la lipolyse

La lipolyse est un mécanisme de consommation des TG qui se produit à la surface des LD via l'action de lipases ciblant les lipides neutres. Les TG peuvent ainsi être séquentiellement dégradés en DG, en MG puis en glycérol tout en libérant 3 acides gras.

Les mécanismes qui contrôlent la lipolyse chez les diatomées ne sont pas connus, mais des hypothèses peuvent être faites par comparaison avec les mécanismes qui se déroulent chez d'autres eucaryotes (**Figure 23**) (D'Andrea, 2016).

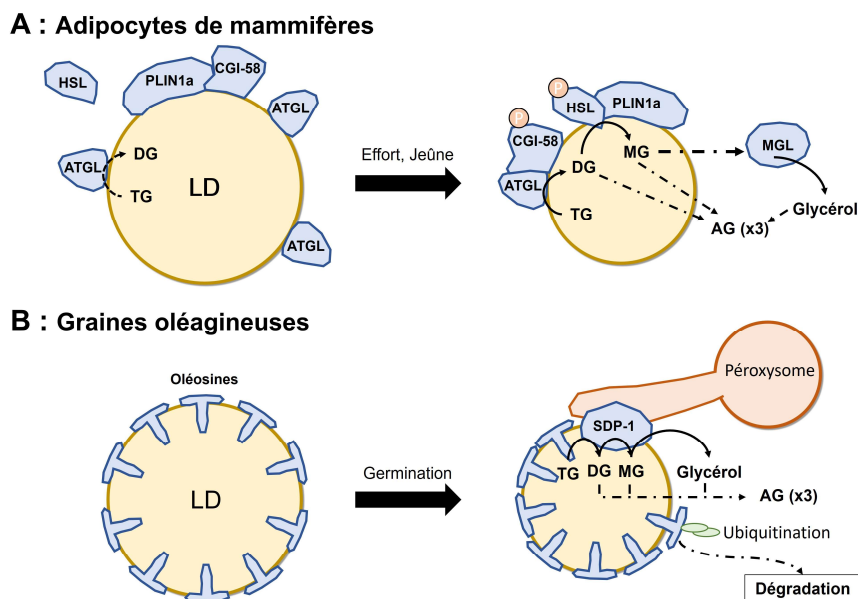


Figure 23 : Schéma simplifié des mécanismes de la lipolyse dans (A) les adipocytes de mammifères et (B) les cellules de graines oléagineuses. AG : Acide Gras, ATGL : Adipose Triglyceride Lipase, CGI-58 : Comparative Gene Identification 58, DG : Diacylglycérol, HSL : Hormone Sensitive Lipase, LD : Lipid Droplet, MG : Monoacylglycérol, MGL : Monoacylglycérol Lipase, PLIN1a : Périlipine 1a, SDP-1 : Sugar-Dependent Lipase 1, TG : Triacylglycérol. (Adapté d'après D'Andrea, 2016).

- Dans les adipocytes des mammifères (**Figure 23A**), la lipase ATGL (Adipose Triglyceride Lipase), est localisée à la surface des LD où elle montre une faible activité basale, car elle est inhibée, notamment par la PLIN1a (Périlipine 1a) un variant d'épissage d'une protéine majeure de LD, qui protège la surface. La PLIN1a immobilise également la protéine CGI-58, coactivatrice de ATGL, ce qui inhibe cette dernière. Lorsque la lipolyse est déclenchée (pendant un jeûne ou un effort physique), une protéine kinase phosphoryle PLIN1a, ce qui libère CGI-58 qui se lie à ATGL et permet l'hydrolyse des TG en DG et 1 acide gras. En parallèle, une seconde lipase, l'hormone sensitive lipase (HSL), est activée par une phosphorylation, ce qui lui permet également de se lier à PLIN1a et ainsi d'être transloquée à la surface de la LD. La HSL hydrolyse les DG en MG et 1 acide gras. La dernière étape de la lipolyse est assurée par une troisième lipase, la MG lipase qui hydrolyse le MG pour former du glycérol et 1 acide gras.
- Dans les graines de plantes oléagineuses comme *Arabidopsis thaliana* (**Figure 23B**), la lipase SDP-1 et la lipase homologue SDP-1 like, ne sont pas présentes en permanence à la surface des LD. La surface de ces dernières est protégée par des oléosines, protéines majeures de LD. La lipolyse est déclenchée suite à la germination. Dans un premier temps,

les oléosines sont ubiquitinées ce qui induit leur dégradation par le protéasome. Ensuite, possiblement suite à la déprotection de la surface de la LD par la dégradation des oléosines, la SDP-1 est délivrée aux LD depuis les péroxysomes par des excroissances de ces derniers (Thazar-Poulot et al., 2015). Cette enzyme est capable d'hydrolyser TG, DG et MG. Les acides gras libérés sont ensuite transportés jusqu'au lieu de leur dégradation, ou réutilisés dans la synthèse d'autres lipides.

Outre la lipolyse des TG, les lipases peuvent également dégrader des lipides polaires, notamment dans des mécanismes de « recyclage » des chaînes acyl, où les acides gras portés par les lipides polaires peuvent être libérés puis intégrer le pool d'acyl-CoA de la cellule, d'où ils peuvent être incorporés à des DG puis des TG. Inversement, des chaînes portées par des lipides neutres peuvent également subir le même sort. Chez les plantes et les levures, il existe ainsi un cycle d'édition des groupes acyl de la PC nommé cycle de Lands où une phospholipase A2 (Phatr3_J39425 ou Phatr3_J49142) libère l'acide gras en position *sn*-2 ce qui produit de la LPC, qui peut ensuite recevoir un nouvel acide gras par l'action d'une acyl-CoA:LPC acyltransférase (LPCAT, Phatr3_J49702) (Figure 24).

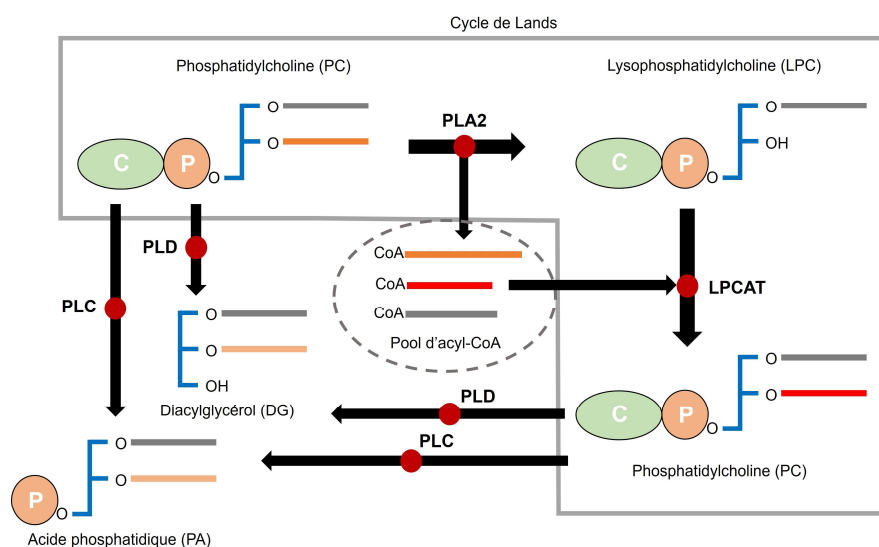


Figure 24 : Le cycle de Lands et les redistributions des chaînes acyl associées par le recyclage. *LPCAT* : AcylCoA:Lysophosphatidylcholine Acyltransférase, *PLA2* : Phospholipase A2, *PLC* : Phospholipase C, *PLD* : Phospholipase D.

Ce phénomène peut ensuite conduire au transfert des chaînes d'acides gras depuis la classe des PC vers la classe des DG ou des PA par l'action d'une phospholipase C (Phatr3_J42683, Phatr3_J46908, Phatr3_J48445, Phatr3_J49771 ou Phatr3_Jdraft1611) ou D (Phatr3_J12431, Phatr3_J24223, Phatr3_J33845, Phatr3_J46400, Phatr3_J47576 ou Phatr3_J48570), respectivement.

2.3.2 – L'autophagie des gouttelettes lipidiques ou lipophagie

Une autre grande voie de dégradation des glycérolipides est envisagée chez les diatomées, il s'agit de la lipophagie. Ce processus utilise les mécanismes de l'autophagie pour la dégradation de lipides. Ces mécanismes sont fortement conservés chez les eucaryotes avec pour fonction la régulation des dégradations intracellulaires et le recyclage de molécules ou d'organites entiers. Chez les animaux, elle se déroule dans les lysosomes, tandis que chez les diatomées, elle a *a priori* lieu dans la vacuole comme chez les plantes.

Plusieurs types de lipophagie existent (**Figure 25**). La macrolipophagie repose sur des protéines, les *Autophagy Related Proteins* (ATG) dont l'action conduit à la formation d'une double-membrane autour des éléments à dégrader. Cela forme un autophagosome qui fusionne ensuite avec la vacuole, où son contenu est dégradé par des enzymes lipolytiques non identifiées (Zienkiewicz and Zienkiewicz, 2020). La microlipophagie repose sur le transfert direct des composés à dégrader par invagination de la membrane de la vacuole. Le transfert de LD ou des autophagosomes vers la vacuole repose sur des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire de membranes et la formation de vésicules, comme les clathrines, les coatomères ou les protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) (Søreng et al., 2018; Nonoyama et al., 2019).

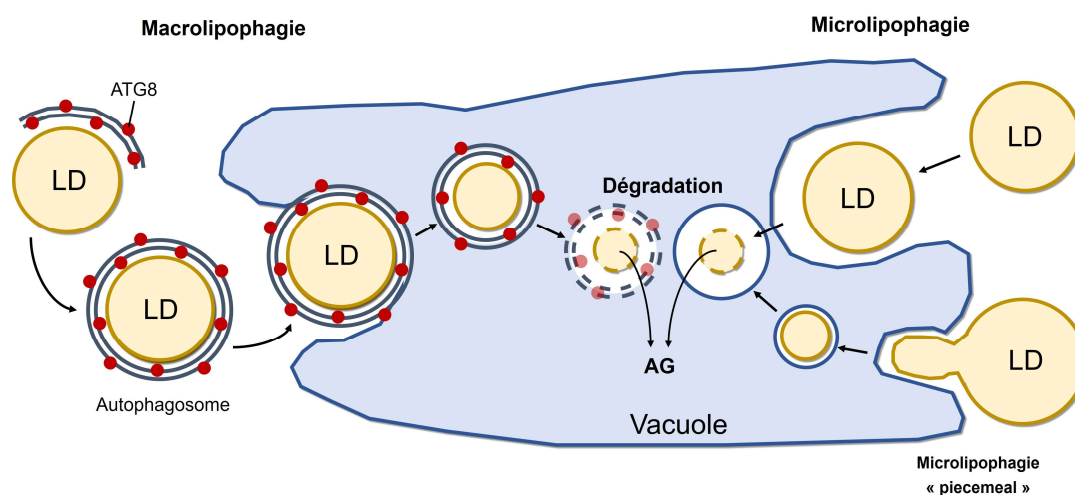


Figure 25 : Schéma des différents types de lipophagie présents chez les eucaryotes.

AG : Acide Gras, ATG8 : *Autophagy-Related Protein 8*, LD : *Lipid Droplet*. (Adapté d'après Zienkiewicz et Zienkiewicz, 2020).

L'autophagie a été peu étudiée chez les straménopiles, mais les résultats obtenus tendent à lui accorder un rôle important dans la dégradation des lipides de LD, et des LD en général. Chez *F. solaris*, trois inhibiteurs de l'autophagie et du trafic membranaire ont été testés : la chloroquine (inhibitrice de l'autophagie), le Pitstop 2 et VER-155008 (inhibiteurs respectifs des

clathrines et de la *Heat Shock Protein 70* (Hsp70) impliquée dans l'autophagie) (Nonoyama et al., 2019). Les auteurs ont placé les cellules en conditions d'accumulation de lipides puis les ont resuspendues en conditions de dégradation (milieu riche en nutriments) avec ajout de l'un des inhibiteurs : les trois traitements ont limité la réduction de taille des LD. Le même essai d'inhibition a été reproduit chez *P. tricornutum* avec des résultats similaires (Nonoyama et al., 2019). Cela suggère un rôle de la lipophagie dans la consommation des lipides chez les diatomées.

Chez *Nannochloropsis oceanica*, une expérience a étudié les variations du transcriptome pendant une carence azotée (provoquant une accumulation de LD) suivie d'une resupplémentation en azote (provoquant leur dégradation). Cette étude a montré que l'expression de l'ATG8 était induite par la condition de retour en milieu riche, et, via des essais de fluorescence, qu'elle interagissait *in vivo* avec la protéine majeure de surface de la LD, suggérant un rôle de la macrolipophagie (Zienkiewicz et al., 2020). L'interaction avec ATG8 est permise par un motif protéique particulier, également retrouvé sur une protéine majeure des LD de *P. tricornutum* (la *Stramenopile Lipid Droplet Protein* StLDP) (Leyland et al., 2020a). Enfin des observations en microscopie électronique à transmission ont montré que de petites portions de grandes LD étaient probablement séparées puis dégradées dans la vacuole, montrant l'implication d'une forme de microlipophagie dite « *piecemeal* », selon un processus fréquemment observé dans les cellules de mammifères (Zienkiewicz et al., 2020).

2.3.3 – La bêta-oxydation des acides gras

Une fois libérés par lipolyse ou lipophagie, les acides gras peuvent être recyclés par incorporation à d'autres lipides, ou bien consommés au niveau de la mitochondrie ou des péroxysomes par le processus de β -oxydation. Ce dernier produit de l'acétyl-CoA et des équivalents réducteurs utilisables dans divers processus métaboliques. Chez les plantes et les levures, ce processus se déroule dans les péroxysomes. Toutefois, en se fondant sur leurs transcrits, les diatomées semblent avoir deux voies, une dans les péroxysomes et une dans la mitochondrie (Chauton et al., 2013). Avant l'une ou l'autre des voies, il faut d'abord que les acides gras soient activés en acyl-CoA par une LACS (la LACS 3 mitochondriale et la LACS 5 péroxysomale ont probablement un rôle dans la β -oxydation de leurs organites respectifs, comme déterminé par réalisation de mutants KO (Hao et al., 2022)). Ensuite l'import se fait différemment suivant l'organite. Au niveau de la membrane des péroxysomes, un transporteur ABC de classe D (Phatr3_J22803, homologue de PXA1 qui assure cette fonction chez *Arabidopsis*) permet l'import. Pour l'import dans les mitochondries, les acyl-CoA sont d'abord convertis en acyl-carnitine au niveau de la Carnitine Palmitoyl-Transférase 1 (CPT1) présente dans la membrane externe de la mitochondrie. L'acyl-carnitine peut traverser la membrane externe par un transport passif puis traverse la membrane interne via l'action d'une

Carnitine:Acyl-Carnitine Translocase (CACT). Une fois dans la matrice mitochondriale, l'acyl-carnitine est reconvertie en acyl-CoA par une Carnitine Palmitoyl-Transférase 2 (CPT2, Phatr3_J48078) (**Figure 26**).

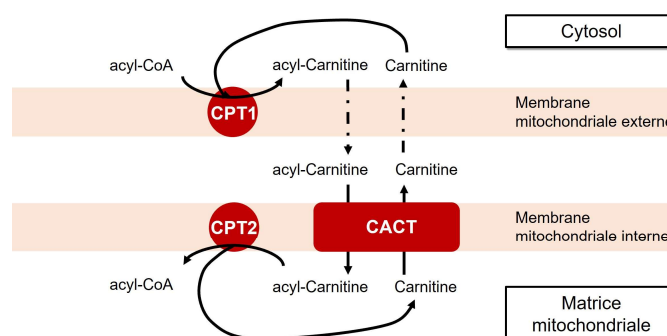


Figure 26 : La navette carnitine permettant le transfert des acyl-CoA à travers la membrane de la mitochondrie. CACT : Carnitine Acylcarnitine Translocase, CPT : Carnitine Palmitoyl Transférase.

La première étape de la β -oxydation est une conversion en trans-2-enoyl-CoA par l'action d'une Acyl-CoA Déshydrogénase (ACAD, dans les mitochondries (M) : Phatr3_J11014, Phatr3_J20310 ou Phatr3_J25932 ; et dans les péroxysomes (P) : Phatr3_J42907) ou d'une Acyl-CoA Oxydase (ACOX, dans les péroxysomes : Phatr3_J19979). Il est converti en 3-hydroxy-acyl-CoA par une Enoyl-CoA Hydratase (ECH), puis en 3-cétoacyl-CoA par une Hydroxy-Acyl-CoA-Déshydrogénase (HADH). Ces deux étapes peuvent être assurées par une enzyme multifonctionnelle (FAO, *Fatty Acid Oxidation complex*) dans les deux compartiments (M : Phatr3_J35240 ; P : Phatr3_55069) ou bien par des enzymes séparées dans la mitochondrie (ECH : Phatr3_J55192, HADH : Phatr3_J39681). Une dernière étape implique une Cétoacyl-CoA Thiolase (KCT, *Ketoacyl-CoA Thiolase*, M : Phatr3_J28068 ou Phatr3_J45947 ; P : Phatr3_J41969) qui produit un acétyl-CoA et libère un acyl-CoA amputé de 2 carbones qui peut suivre à nouveau cette voie métabolique : c'est l'hélice de Lynen (**Figure 27**).

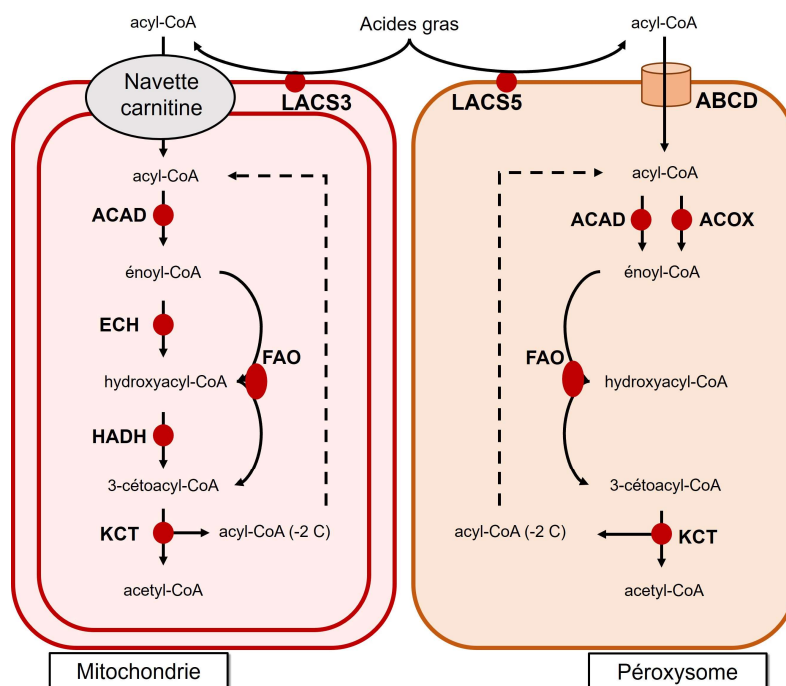


Figure 27 : Les voies de la β -oxydation des acides gras chez les diatomées. ABCD : ATP-Binding Cassette Transporter (Class D), ACAD : Acyl-CoA Déshydrogenase, ACOX : Acyl-CoA Oxydase, ECH : Énoyl-CoA Hydrolase, FAO : Fatty Acid Oxidation complex, KCT : Ketoacyl-CoA Thiolase, LACS : Long-chain Acyl-CoA Synthetase.

Une étude a récemment caractérisé l'une des ACAD (Phatr3_J11014) de *P. tricornutum* (Jallet et al., 2020). Outre l'origine probablement bactérienne de cette enzyme, l'étude a démontré qu'elle était localisée dans la mitochondrie. Par la génération de mutants KO par CRISPR-Cas9, il a été démontré que l'inactivation de cette enzyme provoquait une accumulation de TG et empêchait la remobilisation de ces TG suite à un retour en milieu riche en nutriments. Les auteurs proposent que la β -oxydation ayant pour objectif la production d'énergie à partir de TG soit principalement mitochondriale (Jallet et al., 2020). À l'appui de cette conclusion, l'étude des activités enzymatiques des fractions mitochondriales et péroxysoyales des diatomées *Nitzschia laevis* et *Thalassiosira fluviatilis* ont montré que seule la mitochondrie présentait les activités enzymatiques liées à la β -oxydation (Winkler and Stabenau, 1995).

En parallèle du rôle important de la voie mitochondriale, les transcrits de la β -oxydation péroxysoyale sont également détectés dans les cellules. Une hypothèse est que cette seconde voie de β -oxydation sert au catabolisme des acides gras à longue chaîne issus de lipides polaires, comme c'est le cas dans les cellules de mammifères (Jallet et al., 2020).

Le métabolisme des lipides de *P. tricornutum* a ainsi été en partie caractérisé tant du côté de l'anabolisme que du catabolisme. Les études menées sur les enzymes sont répertoriées dans le **tableau III**.

Il reste toutefois de nombreux processus incertains, notamment sur le transport des lipides, sur la grande diversité de lipases annotées dans le génome, ou sur les rôles respectifs de la lipolyse et de la lipophagie.

Tableau III : Récapitulatif des études de génomique fonctionnelle menées sur les enzymes impliquées dans les voies de production et de dégradation des glycérolipides chez *P. tricornutum*. (voir pages suivantes)

Colonne Localisation : GFP, YFP : Détection de la fluorescence d'une protéine de fusion entre la protéine cible et une protéine fluorescente, et comparaison avec un marqueur de l'organite, EM : Détection en microscopie électronique à transmission par localisation d'anticorps ciblant la protéine et associés à des billes d'or, pred : prédiction par analyse de séquence, Western : détermination par Western Blot dans les extraits de protéines isolés de divers organites.

Colonne Type de Mutant : OE, KD (antisens), KO (TALEN ou CRISPR Cas9)

Colonne Effets principaux : Cr : Croissance, L : Lipides, LN : Lipides neutres, LP : Lipides Polaires, G : Glucides, P : Protéines, MUFAs : Monounsaturated Fatty Acids , PUFAs : Polyunsaturated Fatty Acids , UFAs : Unsaturated Fatty Acids, chl : Chlorophylles.

La mention « Restaure » signifie que l'expression hétérologue de cette protéine dans un modèle (levure ou bactérie) déficient pour la fonction recherchée restaure cette fonction.

Référence	Gène ciblé	Annotation	Localisation	Type de mutant	Effets principaux
Fourniture de précurseurs (pyruvate, NADPH)					
Seo et al. 2020	Phatr3_J3046	Pyruvate Transporter	Plaste (eYFP)	OE	Cr ↑ LN ↑
Xue et al. 2015	Phatr3_J51970	Malic Enzyme	Mitochondrie (EM)	OE	LN ↑
Zhu et al. 2018	Phatr3_J54082	Malic Enzyme	Mitochondrie (pred)	OE	LN ↑
Zhang et al. 2020b	Phatr3_J54082	Malic Enzyme	/	OE	LN ↑ en N-
Synthèse des lipides					
Ma et al. 2014	Phatr3_J50961	Pyruvate déshydrogénase kinase	/	KD	LN ↑
Xie et al. 2013	Phatr3_EG01955	ACCCase	Plaste (pred)	<i>E. coli</i>	LN ↑, MUFAs ↑
Niu et al. 2016	Phatr3_EG02461	GPAT	Plaste (EM)	OE	LN ↑, UFAs ↑
Wang et al. 2020	Phatr3_J3262	GPAT	Plaste (pred)	OE	G & P ↓, L ↑, C16 ↑
Balamurugan et al. 2017	Phatr3_J43099	LPAAT	Plaste (EM)	OE	G & P ↓, L ↑, C16 & PUFAs ↑
Li et al. 2020	Phatr3_J45551	LPAAT	/	OE et KD	L ↑
Wang et al. 2018a	Phatr3_EG02461	GPAT	Plaste (eGFP)	OE	En N+ : chl ↑, G & P ↓, LN ↑
	Phatr3_J43099	LPAAT	Plaste (eGFP)	OE	En N- pas de différence
You et al. 2023	Phatr3_J20460	LPAAT	cERM (eGFP)	KD	Cr ↓ TG ↓
Guiheneuf et al. 2011	Phatr3_J9794	DGAT1	/	<i>S. cerevisiae</i> H1246	Restaure
Niu et al. 2013	Phatr2_J49462	DGAT2A	/	OE	TG ↑
Gong et al. 2013	Phatr2_J49462	DGAT2A	/	<i>S. cerevisiae</i> H1246	Ne restaure pas
	Phatr3_J49544	DGAT2B	/	<i>S. cerevisiae</i> H1246	Restaure
	Phatr3_J49544	DGAT2B	/	<i>P. pastoris</i>	UFA ↑
	Phatr3_J31662	DGAT2C	/	<i>S. cerevisiae</i> H1246	Ne restaure pas
	Phatr3_J43469	DGAT2D	/	<i>S. cerevisiae</i> H1246	Ne restaure pas
Dinamarca et al. 2017	Phatr3_J43469	DGAT2D	/	OE	Cr ↓ L ↑
Bower 2019 (thèse)	Phatr3_J31662	DGAT2C	/	OE	Pas d'effet
	Phatr3_EG00369	DGAT2E	/	OE	Pas d'effet
	Phatr3_J8860	PDAT	/	OE	Dans TG : EPA ↑ C16:0 ↓
Cui et al. 2013	Phatr3_J49708	DGAT3	/	<i>S. cerevisiae</i> H1246	Restaure
Cui et al. 2018	Phatr3_J49708	DGAT3	ER (Western)	OE	L ↑ TG ↑
Zhang et al. 2021c	Phatr3_J9794	DGAT1	cERM (eGFP)	OE	L ↑ TG ↑

Phatr2_J49462	DGAT2A	/	OE	Pas d'effet
Phatr3_J49544	DGAT2B	cERM (eGFP)	OE	L ↑ TG ↑
Phatr3_J31662	DGAT2C	/	OE	Pas d'effet
Phatr3_J43469	DGAT2D	/	OE	Pas d'effet
Phatr3_J49708	DGAT3	cERM (eGFP)	OE	L ↑ TG ↑

Élongation, désaturation et transport des acides gras

Liu et al. 2020	Phatr3_J9361	$\Delta 9$ Acyl-ACP désaturase	Plaste (pred)	<i>S. cerevisiae</i> BY4389	Restaure
Smith et al. 2021	Phatr3_J9361	$\Delta 9$ Acyl-ACP désaturase	Plaste (pred)	OE et KO	OE : EPA ↓ C16:0 ↓ C16:1 ↑ MGDG ↑ DGDG ↓ DG ↓ KO : EPA ↑ C16:0 ↑ C16:1 ↓ MGDG ↓ DGDG ↓ TG ↓
Gong et al. 2011	Phatr3_J10454	Fatty Acyl Thioesterase	/	<i>E. coli</i> et OE	<i>E. coli</i> : L ↑, MUFAs ↑ ; OE : L ↑
Hao et al. 2018	Phatr3_J33198	Fatty Acyl Thioesterase	Plaste (eGFP)	KO	Cr ↓, TG ↑, C16:0 ↑, C16:1 ↑, EPA ↓
Gong et al. 2013	Phatr3_J20143	LACS1	/	<i>S. cerevisiae</i> YB525	Restaure
	Phatr3_J12420	LACS2	/	<i>S. cerevisiae</i> YB525	Ne restaure pas
	Phatr3_J54151	LACS3	/	<i>S. cerevisiae</i> YB525	Ne restaure pas
	Phatr3_J45510	LACS4	/	<i>S. cerevisiae</i> YB525	Restaure
	Phatr3_J17720	LACS5	/	<i>S. cerevisiae</i> YB525	Ne restaure pas
Hao et al. 2021	Phatr3_J20143	LACS1	cERM (GFP)	KO	LP ↓
	Phatr3_J12420	LACS2	Cytosol (GFP)	KO	Pas d'effet
	Phatr3_J54151	LACS3	Mitochondrie (GFP)	KO	Cr ↓ TG ↓
	Phatr3_J45510	LACS4	Cytosol (GFP)	KO	Pas d'effet
	Phatr3_J17720	LACS5	Péroxyosome (GFP)	KO	Cr ↓

Catabolisme des lipides

Barka et al. 2016	Phatr3_J1971	Patatin-like lipase	/	KD	TG ↑, EPA ↓, C16:0 ↑
Li et al. 2018	Phatr3_J37711	Lipase	PPM (eGFP)	KD	Cr ↓, TG ↑
Calleja et al. 2015 (brevet)	Phatr3_J54974	CGI-58 like	/	KD	Cr ↑, TG ↑
Shu et al. 2023	Phatr3_J54974	CGI-58 like	/	OE	Cr ↓, LN ↑, TG ↑, EPA ↑
Wang et al. 2015	Phatr3_J46511	PNPLA3	/	OE	LN ↑, C16:1 ↓, C20:4 ↑
Jallet et al. 2020	Phatr3_J11014	ACAD	Mitochondrie (YFP)	KO	TG ↑

3 – Stress et formation de gouttelettes lipidiques

L'application d'un stress sur une culture de microalgues est une méthode courante pour pouvoir étudier l'accumulation de lipides ainsi que la formation de gouttelettes lipidiques (LD). Chez *P. tricornutum*, les stress les plus communément étudiés sont les carences nutritives, avec une attention particulière sur le stress azoté et le stress phosphoré (Valenzuela et al., 2012; Guerra et al., 2013; Yang et al., 2013, 2014; Ge et al., 2014; Abida et al., 2015; Alipanah et al., 2015, 2018; Feng et al., 2015; Levitan et al., 2015b; Cruz De Carvalho et al., 2016; Longworth et al., 2016; Matthijs et al., 2016; Popko et al., 2016; Remmers et al., 2018; Huang et al., 2019; Scarsini et al., 2022). Ici, nous nous focaliserons sur le stress azoté. Cette partie a deux objectifs. D'une part, elle vise à présenter les effets du stress azoté sur la biochimie de la cellule comme sur son métabolisme. D'autre part, elle propose une description de la biosynthèse, de la composition et de la structure des LD induites par ce stress.

3.1 – Les effets du stress azoté sur le métabolisme de *Phaeodactylum tricornutum*

3.1.1 – Effets biochimiques et physiologiques

Le stress azoté induit sur les cellules de *P. tricornutum* une série de modifications physiologiques bien décrites. La carence en azote induit ainsi un arrêt ou un fort ralentissement de la croissance cellulaire, une diminution progressive des taux de pigments et de protéines tandis que dans le même temps, le contenu en lipides neutres (LN) augmente fortement. En parallèle des taux de pigments, l'activité photosynthétique mesurée par exemple à travers le rendement quantique maximal du photosystème II (Fv/Fm) diminue également.

Au sein des lipides, le profil d'acides gras est modifié, avec une augmentation de la proportion relative des SFA et des MUFAs (principalement du C16:0 et du C16:1 n-7) et une diminution des PUFAs (principalement de l'EPA). La distribution des classes de lipides varie également, avec une diminution des taux de MGDG, DGTS et de PG. Il semble que les taux de LPC et de lyso-bétaïne lipides diminuent également, tandis que ceux des autres classes restent constants. Cependant, comme le taux de TG augmente fortement, la proportion relative des lipides polaires dans les glycérolipides totaux diminue (Abida et al., 2015; Popko et al., 2016; Huang et al., 2019; Scarsini et al., 2022).

L'évolution des taux de glucides est plus variable selon les études qui décrivent soit une diminution (Guerra et al., 2013; Yang et al., 2013), soit une augmentation initiale puis une stabilisation ou une légère diminution au cours du temps (Longworth et al., 2016; Remmers et al., 2018; Huang et al., 2019).

3.1.2 – Effets métaboliques

Les mécanismes à l'origine des changements se déroulant lors de la carence azotée ont été étudiés à travers des études "omiques" à différents niveaux, en utilisant les méthodes de métabolomique, de transcriptomique et de protéomique. Les études ont démontré que plusieurs grandes voies métaboliques étaient différentiellement exprimées pendant une carence. Avant de les passer en revue, il est à noter que quelques différences entre les études existent. Elles peuvent être dues aux conditions de culture différentes, comme par exemple l'utilisation d'une carence où l'on retire complètement l'azote (*deprivation* ou *starvation*) plutôt qu'une limitation où la concentration est juste diminuée. Les cultures peuvent être menées en *batch* ou en modes continus et semi-continus. Les différences peuvent aussi provenir de durées d'études variables, ou bien d'études avec des intervalles de temps différents entre les prélèvements. Les variations peuvent enfin également être liées à des différences entre la transcriptomique et la protéomique par l'action de régulations post-transcriptionnelles (Longworth et al., 2016).

3.1.2.1 – Modifications de la capture, de l'assimilation et du métabolisme de l'azote

En premier lieu, la capture et le métabolisme de l'azote sont fortement altérés (**Figure 28**). D'une part, les cellules sur-expriment les différents transporteurs d'azote extracellulaire sous forme de nitrates, d'ammonium ou d'urée (Valenzuela et al., 2012; Yang et al., 2013; Alipanah et al., 2015; Levitan et al., 2015b; Matthijs et al., 2016; Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022) et sur-expriment certaines enzymes liées à l'assimilation de cet azote comme les nitrate et nitrite réductases (Yang et al., 2013; Levitan et al., 2015b; Matthijs et al., 2016; Scarsini et al., 2022), ou l'uréase C (Phatr3_J29702) qui produit de l'ammonium à partir d'urée (Alipanah et al., 2015; Remmers et al., 2018). Notons toutefois que la nitrate réductase (NR) (Longworth et al., 2016) ou l'uréase (Levitan et al., 2015b) sont parfois rapportées comme étant sous-exprimées. L'étude des pools de métabolites montre que la concentration en ornithine, intermédiaire du cycle de l'urée (ou cycle ornithine-urée) diminue avec la carence (Remmers et al., 2018), ce qui suggère une orientation de ce cycle vers la production d'ammonium. Globalement, les cellules augmentent leur capacité de capture et d'assimilation de l'azote extracellulaire.

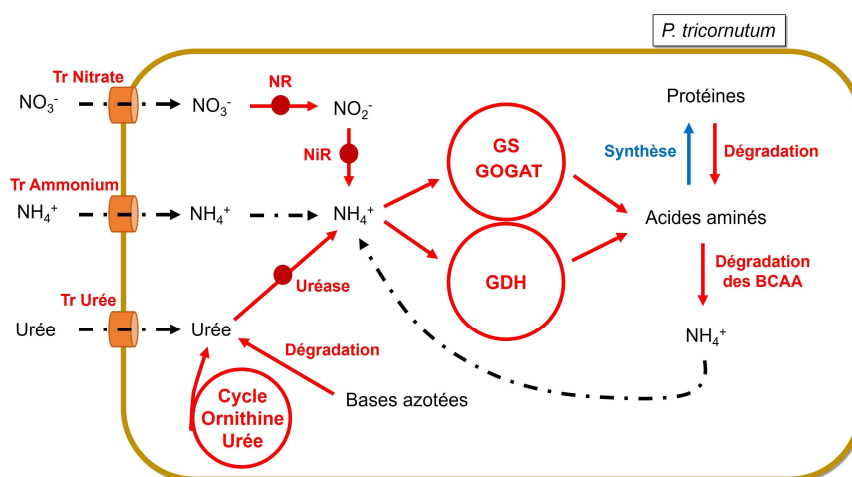


Figure 28 : Les réorientations de la capture, de l'assimilation et du métabolisme de l'azote chez *P. tricornutum* pendant une carence azotée. BCAA : Branched-Chain Amino Acids, COU : Cycle Ornithine-Urée, GDH : Glutamate déshydrogénase, GS-GOGAT : Glutamine Synthase-Glutamine:2-Oxoglutarate Aminotransférase, NiR : Nitrite Réductase, NR : Nitrate Réductase, Tr : Transporteur.

D'autre part, les molécules azotées intracellulaires sont remobilisées. Les bases azotées voient leur production sous-réglée tandis que leur dégradation est sur-réglée (Alipanah et al., 2015). D'autres molécules contenant de l'azote sont traitées par des amidases qui en libèrent de l'ammonium (Alipanah et al., 2015; Longworth et al., 2016; Matthijs et al., 2016; Scarsini et al., 2022). La synthèse des protéines est également diminuée car la plupart des gènes codant les ribosomes et les ARN de transfert sont sous-exprimés rapidement (Longworth et al., 2016; Matthijs et al., 2016). En parallèle, la dégradation de protéines est favorisée par la sur-expression du protéasome, et peut-être de certains gènes de l'autophagie (Alipanah et al., 2015; Longworth et al., 2016). Le métabolisme des acides aminés est lui aussi fortement réorganisé avec des différences suivant les familles d'acides aminés. Ce sont les métabolites dont la concentration diminue le plus pendant la carence azotée (Guerra et al., 2013; Popko et al., 2016). D'un côté, les deux voies de production d'acides aminés à partir d'ammonium sont sur-réglées dans la plupart des études : il s'agit de la voie Glutamine Synthase-Glutamine:2-Oxoglutarate Aminotransférase (GS-GOGAT) (Yang et al., 2013, 2014; Levitan et al., 2015b; Matthijs et al., 2016; Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022) et de la voie Glutamate Déshydrogénase (GDH) (Valenzuela et al., 2012; Alipanah et al., 2015; Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022). En parallèle, le catabolisme des acides aminés augmente (Yang et al., 2013; Alipanah et al., 2015). En particulier les acides aminés ramifiés (*Branched Chain Amino Acids*, BCAA : leucine, isoleucine et valine) voient leur catabolisme fortement augmenter (Ge et al., 2014; Scarsini et al., 2022).

Ces éléments suggèrent donc que les cellules pratiquent un recyclage accru de l'azote de leurs molécules. Ce mécanisme permet de produire uniquement les protéines indispensables au maintien de la cellule dans un état de vie ralentie et à sa protection.

3.1.2.2 – Modifications de la photosynthèse

Le recyclage de l'azote concerne également la chlorophylle *a*, dont une molécule contient 4 atomes d'azote, et les protéines photosynthétiques en général.

Du côté de la phase claire de la photosynthèse, la plupart des protéines sont sous-régulées (**Figure 29**). C'est le cas de la plupart des LHC, des protéines de la chaîne de transfert d'électrons, mais aussi de la machinerie de biosynthèse de la chlorophylle et des autres pigments (Valenzuela et al., 2012; Yang et al., 2013, 2014; Ge et al., 2014; Alipanah et al., 2015; Longworth et al., 2016; Matthijs et al., 2016; Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022). Les rares LHC qui sont sur-régulés ont par ailleurs été identifiés comme photoprotecteurs (Remmers et al., 2018).

Du côté de la phase sombre (**Figure 29**), il y a également sous-régulation, comme le montre la diminution d'abondance de la RubisCO (Longworth et al., 2016) et de l'expression de la plupart des gènes du cycle de Calvin-Benson-Bassham (Valenzuela et al., 2012; Alipanah et al., 2015; Matthijs et al., 2016; Scarsini et al., 2022). Un élément supplémentaire suggérant la sous-régulation de ce cycle est une accumulation de sedoheptulose observée dans une étude de métabolomique (Popko et al., 2016). Ce sucre en C7 est un intermédiaire du cycle de Calvin-Benson-Bassham qui, dans cette étude, atteignait une concentration supérieure à celle du glucose (Popko et al., 2016).

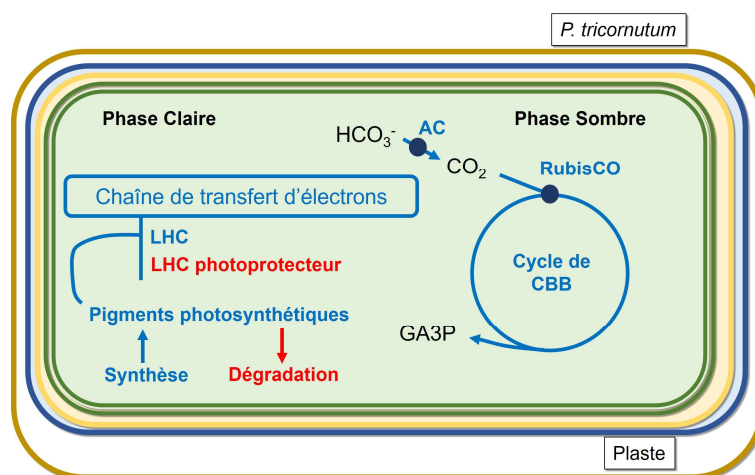


Figure 29 : Les réorientations de la photosynthèse chez *P. tricornutum* pendant une carence azotée. AC : Anhydrase Carbonique, CBB : Calvin-Benson-Bassham, GA3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate, LHC : Light Harvesting Complex, RubisCO : Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Oxygénase.

Il semble donc que les cellules diminuent leur capacité à assimiler du carbone *de novo*. Ceci est corroboré par plusieurs observations qui montrent que, en conditions non carencées les cultures consomment rapidement le carbone inorganique dissous dans le milieu, tandis que la mise en place d'une carence azotée induit une réaugmentation de la concentration en carbone inorganique dissous (Valenzuela et al., 2012; Scarsini et al., 2022). Enfin, la sous-régulation du CCM biophysique, observée par la sous-régulation de plusieurs anhydrases carboniques (Yang et al., 2014; Alipanah et al., 2015) soutient également cette conclusion.

3.1.2.3 – *Modifications de l'orientation du carbone*

Si le carbone est moins fixé par photosynthèse, l'accumulation de lipides et la production d'énergie de la cellule doivent faire appel au recyclage des molécules présentes. Certains des mécanismes mentionnés plus haut dans le métabolisme de l'azote font le lien avec le métabolisme du carbone, le catabolisme d'un acide aminé produisant à la fois de l'ammonium et des squelettes carbonés (**Figure 30**). Ainsi, les BCAA dont la dégradation est sur-exprimée donnent du succinyl-CoA, d'autres acides aminés comme l'asparagine donnent de l'AOA, d'autres encore fournissent de l'acétyl-CoA comme la lysine ou la tyrosine (Remmers et al., 2018; Liang et al., 2019; Pan et al., 2020).

Toutes ces molécules sont des intermédiaires du cycle de Krebs et peuvent donc servir à produire du pouvoir réducteur et de l'ATP, mais aussi être dirigées vers d'autres voies comme la synthèse des acides gras. En stress azoté, la plupart des enzymes du cycle de Krebs sont sur-régulées (Alipanah et al., 2015; Levitan et al., 2015b; Longworth et al., 2016; Matthijs et al., 2016; Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022), ce qui se traduit par une diminution de la concentration de la plupart des métabolites intermédiaires qui le composent (Alipanah et al., 2015; Popko et al., 2016) (**Figure 30**). Un des intermédiaires voit sa concentration varier dans la plupart des études : il s'agit du 2-oxoglutarate (ou α -cétoglutarate), produit du catabolisme des acides aminés, qui relie ainsi les systèmes GS-GOGAT et GDH, et le cycle de Krebs. Sa concentration est tantôt augmentée (Remmers et al., 2018) voire multipliée par 18 (Guerra et al., 2013), tantôt diminuée (Alipanah et al., 2015). Dans le cas où le taux est augmenté, c'est un signe du fort flux de carbone en provenance des acides aminés, dans l'autre cas, cela pourrait signifier qu'il est hautement consommé.

Le métabolisme des glucides est également orienté vers le catabolisme (**Figure 30**). La biosynthèse de chrysolaminarine est sous-régulée tandis que sa dégradation est sur-régulée (Alipanah et al., 2015; Scarsini et al., 2022), ce qui se traduit par l'apparition d'oligosides de moins de 7 unités (Popko et al., 2016), de maltose et de glucose, et par une augmentation de citrate dans le cycle de Krebs (Remmers et al., 2018), ce dernier n'apparaît toutefois pas dans

toutes les études (Guerra et al., 2013; Alipanah et al., 2015). Le glucose obtenu par dégradation de la chrysolaminarine peut ensuite emprunter plusieurs voies.

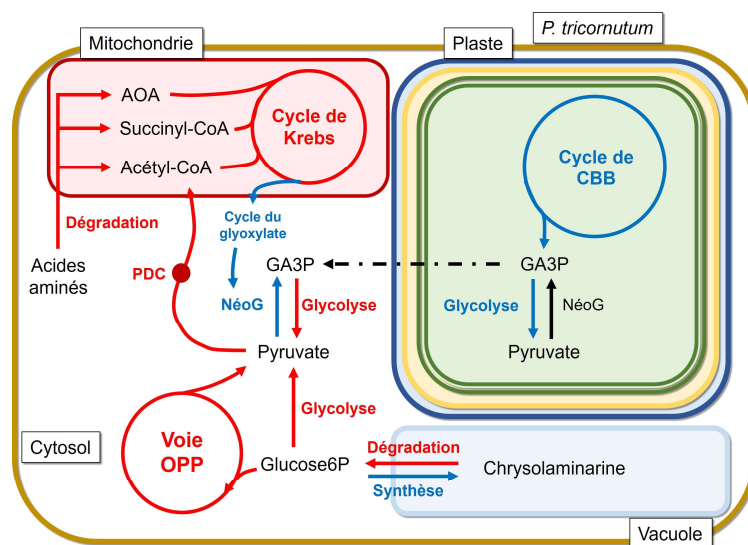


Figure 30 : Les réorientations du métabolisme central du carbone chez *P. tricornutum* pendant une carence azotée. AOA : Acide Oxaloacétique, CBB : Calvin-Benson-Bassham, GA3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate, LHC : Light Harvesting Complex, Néog : Néoglucogenèse, PDC : Pyruvate Dehydrogenase Complex, Voie OPP : Voie Oxydative des Pentose-Phosphate.

Le glucose peut emprunter la voie oxydative des pentose-phosphate qui est sur-régulée (Alipanah et al., 2015; Longworth et al., 2016; Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022), ce qui implique la production de ribose avec une production conjointe de pouvoir réducteur sous forme de NADPH, H⁺ (**Figure 30**). Le glucose-6-phosphate produit suite à la dégradation de la chrysolaminarine peut également être converti en pyruvate via la glycolyse. En règle générale, les gènes de la glycolyse cytosolique sont sur-exprimés (Valenzuela et al., 2012; Ge et al., 2014; Yang et al., 2014; Longworth et al., 2016) tandis que la glycolyse dans le plaste est sous-régulée (Alipanah et al., 2015; Scarsini et al., 2022). Cependant, la présence d'isoformes de gènes de la glycolyse dans plusieurs organites différents, et qui peuvent fonctionner en tant qu'enzymes de la glycolyse et de la néoglucogenèse (voie inverse de la glycolyse), complique l'analyse des régulations du métabolisme central du carbone (Remmers et al., 2018). Toutefois, la sur-expression d'enzymes mitochondriales de la glycolyse et du cycle de Krebs suggère une orientation du pyruvate produit par la glycolyse vers ce dernier.

D'autres éléments tendent à montrer une orientation vers la glycolyse au détriment de la néoglucogenèse (**Figure 30**). Chez les diatomées, il existe un cycle du glyoxylate qui dirige notamment certains intermédiaires du cycle de Krebs vers la néoglucogenèse. Deux enzymes clés de ce cycle, l'isocitrate lyase et la malate déshydrogénase, sont sous-exprimées en carence d'azote (Yang et al., 2013; Remmers et al., 2018), ce qui suggère une inhibition de la

néoglucogénèse. L'une des enzymes clés de cette voie, la PEP carboxykinase, est également sous-réglée (Yang et al., 2013; Levitan et al., 2015b). Une étude a réalisé un mutant KD d'une PEP carboxykinase (Phatr3_EG02232) chez *P. tricornutum* dont les effets ont mimé une carence en azote, c'est à dire avec une augmentation du taux de TG et une diminution de l'activité photosynthétique, sans toutefois diminuer la croissance (Yang et al., 2016).

La direction du métabolisme central vers l'accumulation du pyruvate se vérifie aussi par la manière dont les enzymes du carrefour du pyruvate sont régulées (**Figure 30**). Les enzymes du complexe PDC (Pyruvate Dehydrogenase Complex) sont en majorité sur-exprimées (Ge et al., 2014; Yang et al., 2014; Levitan et al., 2015b; Matthijs et al., 2016) ce qui produit de l'acétyl-CoA utilisable ensuite dans la synthèse des lipides ou dans le cycle de Krebs pour générer de l'ATP et des équivalents réducteurs. Par ailleurs, plusieurs enzymes du carrefour du pyruvate sont sur-exprimées (Valenzuela et al., 2012; Ge et al., 2014; Alipanah et al., 2015; Remmers et al., 2018), potentiellement comme actrices du CCM biochimique supposé de *P. tricornutum*, permettant d'assurer le niveau minimal de photosynthèse et produisant du pouvoir réducteur par l'action de l'enzyme malique. La production d'AOA peut aussi simplement rejoindre le cycle de Krebs pour générer énergie et pouvoir réducteur (Remmers et al., 2018). De manière intrigante, là où une enzyme malique (Phatr3_J51970) est sur-exprimée (Valenzuela et al., 2012) l'autre enzyme malique (Phatr3_J54082) est sous-exprimée (Ge et al., 2014).

Toutes ces réorientations conduisent à la production de pyruvate, d'acétyl-CoA, de pouvoir réducteur et d'énergie. Cependant, les études de métabolomique ont montré que la concentration en pyruvate et en acétyl-CoA dans la cellule diminuait avec la carence (Guerra et al., 2013; Remmers et al., 2018), ce qui suggère leur consommation dans d'autres processus métaboliques, comme la synthèse des lipides neutres.

3.1.2.4 – *Modifications du métabolisme des lipides*

L'augmentation importante des taux de LN lors d'une carence en azote pourrait être liée à une expression accrue des enzymes des voies de synthèse des acides gras et des TG. Cependant, les différentes études de transcriptomique et de protéomique ont montré que la réponse de ces voies métaboliques est plus complexe (**Figure 31**).

Au niveau de l'ACCCase cytosolique (Phatr3_J55209), qui assure la première étape de la synthèse des acides gras en convertissant l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, les études des transcrits montrent tantôt une sous-expression (Valenzuela et al., 2012; Levitan et al., 2015b) tantôt aucune différence d'expression (Remmers et al., 2018). L'ACCCase plastidiale (Phatr3_J54926) est parfois sur-exprimée (Valenzuela et al., 2012; Ge et al., 2014), ce qui stimulerait la première étape de la synthèse des acides gras dans le plaste, mais elle est également rapportée comme étant sous-exprimée dans une autre étude (Levitan et al.,

2015b). Aux niveaux transcriptionnel comme protéomique, la voie de synthèse des acides gras ne montre pas non plus de tendance claire, l'expression de ces gènes diminue parfois (Valenzuela et al., 2012; Alipanah et al., 2015; Scarsini et al., 2022), augmente parfois, du moins pour certaines enzymes du complexe FASII (Ge et al., 2014; Yang et al., 2014; Longworth et al., 2016), ou n'est pas différente entre les conditions de carence et sans carence d'azote (Remmers et al., 2018).

Les élongations et désaturations des acides gras varient de manière plus claire : l'élongation est sous-exprimée (Yang et al., 2013; Longworth et al., 2016), les désaturases impliquées dans la synthèse des PUFAs le sont également (Yang et al., 2013), à l'inverse des désaturases à l'origine de la formation de MUFAs qui, elles, sont sur-exprimées (Valenzuela et al., 2012; Yang et al., 2013; Remmers et al., 2018). Ces observations correspondent aux changements de profils d'acides gras observés en carence azotée.

Pour ce qui est de la synthèse des glycérolipides, et en particulier des TG, la plupart des gènes ne sont pas régulés différemment (Levitan et al., 2015b; Remmers et al., 2018), ou bien différentes isoformes présentent des régulations opposées (Alipanah et al., 2015). Par exemple, les DGAT ne sont pour la plupart pas sur-exprimées, excepté la DGAT1 qui voit son expression légèrement augmenter (Yang et al., 2013; Ge et al., 2014; Remmers et al., 2018), et parfois la DGAT2D (Alipanah et al., 2015; Scarsini et al., 2022).

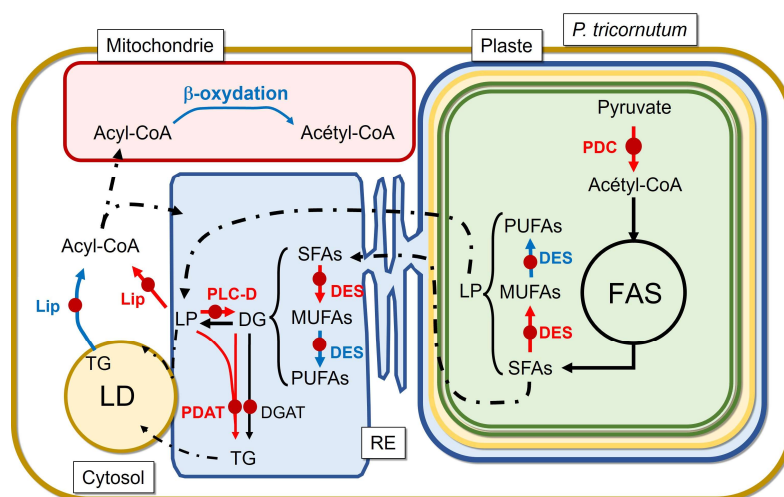


Figure 31 : Les réorientations du métabolisme des lipides chez *P. tricornutum* pendant une carence azotée. Les flèches bleues indiquent une diminution par rapport à la situation sans carence, les flèches rouges une augmentation, les flèches noires indiquent une absence de changement ou une variabilité suivant les études. DES : Désaturase, DG : Diacylglycérol, DGAT : Diacylglycérol Acyltransférase, FAS : Fatty Acid Synthase, LD : Lipid Droplet, Lip : Lipase, LP : Lipides Polaires, MUFAs : Monounsaturated Fatty Acids, PDAT : Phospholipide:Diacylglycérol Acyltransférase, PDC : Pyruvate Dehydrogenase Complex, PUFAs : Polyunsaturated Fatty Acids, RE : Réticulum Endoplasmique, SFAs : Saturated Fatty Acids.

Cependant, les DGAT ne sont pas les seules enzymes capables de produire des TG, et l'examen des PDAT indique en général une sur-expression (Yang et al., 2013; Alipanah et al., 2015; Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022), ce qui suggère que les cellules convertissent des phospholipides en TG. De manière intéressante, une étude de métabolomique ayant comparé les profils d'acides gras des différentes espèces lipidiques de chacune des classes a mis en évidence que les bêtaïne lipides pouvaient être une source de lipides à l'origine de TG dans cette voie (Popko et al., 2016). Du fait de similarités physico-chimiques avec la PC (voir les **Figures 10 et 12**), il est possible que la PDAT soit capable d'utiliser du DGTS ou du DGTA.

Les lipides polaires peuvent être recyclés en DG (puis en TG) par une autre voie impliquant des lipases. Les phospholipases C et D peuvent ainsi produire du PA (Acide Phosphatidique) ou du DG à partir de PC, PE, PI ou PG, et il se trouve que certaines de ces phospholipases (PLC : Phatr3_J46908 et Phatr3_Jdraft1611 ; PLD : Phatr3_J12431, Phatr3_J24223, Phatr3_J46400 et Phatr3_J48570) sont sur-exprimées lors de la carence (Alipanah et al., 2015; Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022). De manière cohérente, il a été observé que les pools de PI et de PA étaient diminués (Remmers et al., 2018). Une PAP (Phatr3_J40261) qui convertit le PA en DG est également sur-exprimée (Yang et al., 2013). Pour les glycolipides, un stress azoté induit une réduction de la teneur en MGDG en parallèle d'une augmentation de la teneur en SQDG et DGDG (Abida et al., 2015). Cela est soutenu par la sous-expression d'un gène codant la MGD en parallèle d'une sur-expression d'un gène codant la DGD (Scarsini et al., 2022) (Voir la **Figure 19**).

Parmi les enzymes annotées comme appartenant à la famille des α/β hydrolases, donc potentiellement des lipases, un certain nombre (Phatr3_J31492, Phatr3_J41624, Phatr3_J44028, Phatr3_EG01635, Phatr3_EG02610) sont sur-exprimées (Yang et al., 2013; Remmers et al., 2018) tandis que d'autres (Phatr3_J44231, Phatr3_J50397) sont sous-exprimées. Les premières pourraient être des lipases spécifiques des lipides polaires tandis que les secondes pourraient cibler les TG ou les DG, et leur inhibition serait ainsi favorable à une accumulation. Dans le sens d'une réutilisation des chaînes d'acides gras issues des lipides polaires dans les LN, l'expression des enzymes du catabolisme des acides gras diminue (Yang et al., 2013; Longworth et al., 2016).

Pour résumer l'ensemble des réponses métaboliques à une carence azotée (**Figure 32**), la biosynthèse de TG observée ne semble pas être régulée par une sur-expression des enzymes de synthèse de lipides, mais bien plus par un double recyclage : d'une part, la réorientation de composés azotés et carbonés apportent des précurseurs à la synthèse (pyruvate, acétyl-CoA, pouvoir réducteur) ; d'autre part, les lipides polaires sont recyclés par conversion en DG, ou récupération de certaines de leurs chaînes d'acides gras.

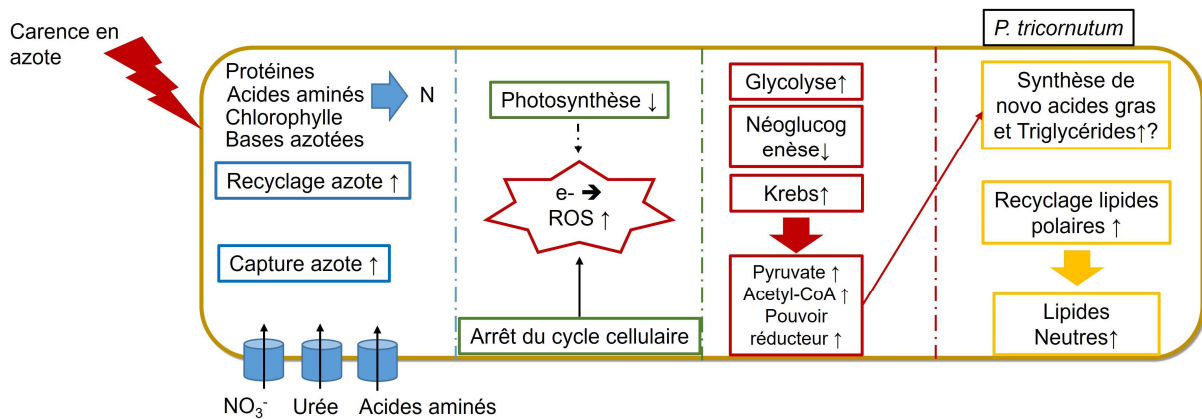


Figure 32 : Récapitulatif des principaux effets d'un stress azoté sur une cellule de *P. tricornutum*.

Une fois accumulés, les TG ne peuvent pas être simplement stockés dans le cytosol car ils sont hydrophobes, ils doivent donc être conservés dans des organites spécifiques : les gouttelettes lipidiques.

3.2 – Caractéristiques biochimiques des gouttelettes lipidiques

3.2.1 – Composition en lipides et pigments

Les gouttelettes lipidiques (LD) se trouvent chez tous les eucaryotes, ainsi que certains procaryotes (Wältermann et al., 2004). Elles portent divers noms comme oléosome, adiposome, globule gras (*oil globule*), corps gras (*oil body*) ou corps lipidique (*lipid body*). Ces noms ne reflètent cependant pas une différence de structure biologique, mais bien plus les conventions des différentes communautés de chercheurs qui les étudient (Goold et al., 2015).

Chez tous les organismes qui en possèdent, les LD ont une architecture commune : elles sont faites d'un cœur de LN, entouré d'une simple couche de lipides polaires (Lupette et al., 2019; Leyland et al., 2020a) (**Figure 33**). C'est ainsi le seul organite à ne pas être délimité par une double couche lipidique, probablement pour des raisons thermodynamiques. En effet, la plupart des organites ont un intérieur et un extérieur aqueux, les lipides polaires s'agencent donc en double couche de telle sorte à ce que les têtes polaires (hydrophiles) pointent vers l'intérieur et l'extérieur, tandis que les chaînes aliphatiques hydrophobes se regroupent au centre de la double couche. Dans les LD, l'intérieur est constitué de composés hydrophobes, et les lipides polaires peuvent donc s'organiser en simple couche, les chaînes aliphatiques orientées vers les lipides du cœur (Leyland et al., 2020a).

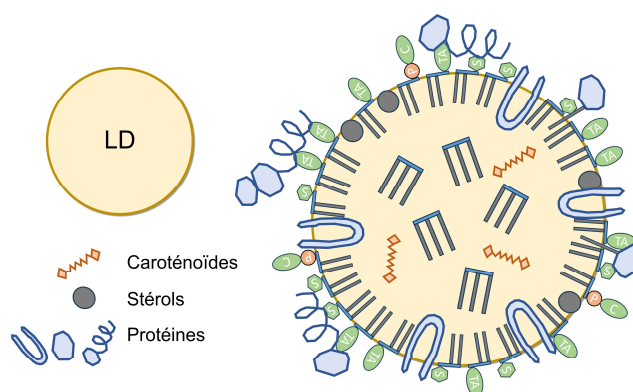


Figure 33 : Schéma d'une gouttelette lipidique de *P. tricornutum*. Les glycérolipides sont représentés avec les mêmes symboles que précédemment (Figure 9 à 12). L'architecture des gouttelettes lipidiques (LD) est celle proposée d'après Lupette et al. (2019). L'association des protéines à la surface des LD est représentée d'après Kory et al. (2016) et Olzmann and Carvalho (2019).

Chez *P. tricornutum*, les lipides neutres des LD sont principalement constitués de TG qui représentent 99% des glycérolipides en pourcentage molaire (Lupette et al., 2019). Plusieurs classes de lipides ont été détectées dans la membrane, avec comme composants majoritaires du DGTA (0,4% molaire du total des glycérolipides de LD, du SQDG (0,35 % molaire), et de la PC (0,15 % molaire) (Lupette et al., 2019). La membrane contient également du brassicastérol

qui représente moins de 5 % molaire des lipides totaux (Lupette et al., 2019). Des pigments caroténoïdes ont également été détectés dans les LD de *P. tricornutum* (Yoneda et al., 2016; Lupette et al., 2019), le principal étant la fucoxanthine suivi du β -carotène et de deux autres caroténoïdes mineurs, le γ -carotène et la diatoxanthine. La fucoxanthine est le caroténoïde majeur des diatomées. À l'inverse, le β -carotène est présent en très faible quantité dans les extraits de pigments de cellules entières, ce qui suggère un fort enrichissement des LD en ce second caroténoïde (Lupette et al., 2019). La présence de caroténoïdes a également été observée dans les LD de la diatomée *F. solaris* (Nonoyama et al., 2019). Bien que ces pigments puissent être issus d'une contamination par le plaste au moment de l'isolement des LD, l'absence de chlorophylles dans les fractions de LD ne soutient pas cette hypothèse (Lupette et al., 2019).

3.2.2 – Composition en protéines

Les LD contiennent également de nombreuses protéines que l'on peut classer en deux catégories (Kory et al., 2016; Olzmann and Carvalho, 2019) (**Figure 34**).

Les protéines de classe I sont associées de manière stable aux membranes de LD grâce à un domaine en épingle à cheveu (*hairpin*), les deux extrémités N et C de la protéine étant exposées à l'extérieur. Ce type de domaines permet un ancrage à la fois dans les doubles couches lipidiques du RE et la simple couche des LD.

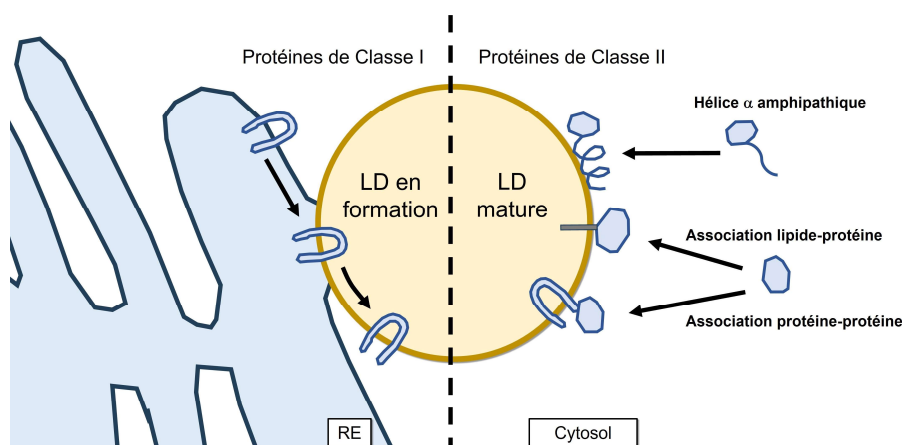


Figure 34 : Représentation schématique de l'association des deux classes de protéines avec les LD. LD : *Lipid Droplet*, RE : *Réticulum Endoplasmique*.

Les protéines de classe II sont produites dans le cytosol et viennent ensuite s'associer, de manière éventuellement transitoire, à la surface des LD. Ces protéines peuvent se lier aux LD de façons diverses, par exemple par interaction avec une protéine de classe I, ou par ancrage lipidique suite à une acylation post-traductionnelle de la protéine. La plupart des protéines de

classe II s'associent cependant aux LD via leur structure en hélice α amphipatique, une hélice caractérisée par une ségrégation des acides aminés à résidu hydrophobe d'un côté de l'hélice et des acides aminés à résidu polaire du côté opposé. Les monocouches de lipides polaires qui caractérisent les LD présentent souvent des défauts de compaction à leur surface exposant une partie du cœur hydrophobe et permettant ainsi l'insertion de ce type d'hélice, le côté contenant les résidus hydrophobes orienté vers l'intérieur de la LD (Kory et al., 2016; Olzmann and Carvalho, 2019).

3.2.2.1 – *Les protéines majeures de gouttelettes lipidiques*

Les LD des plantes, des algues vertes, des mammifères et des levures contiennent toutes des protéines spécifiques associées aux LD. Ce sont les oléosines et caléosines des plantes, la *Major Lipid Droplet Protein* des algues vertes ou les périlipines des mammifères. Chez *P. tricornutum*, deux protéines majeures associées aux LD ont été décrites : la *Stramenopile Lipid Droplet Protein* (StLDP) (Yoneda et al., 2016) et la *Phaeodactylum tricornutum Lipid Droplet Protein* (PtLDP1) (Wang et al., 2017). La sur-expression de cette dernière cause une augmentation du contenu en lipides, du contenu en TG, de la taille des LD et surtout une sur-expression des gènes codant une DGAT2, une GPAT et deux enzymes du complexe FASII (Wang et al., 2017). La sur-expression de la StLDP n'induit pas la formation de LD, mais, dans des conditions favorables à la formation de LD (carence en nutriments), elle augmente significativement le nombre des LD, ainsi que leur taille et la teneur en lipides neutres (Yoneda et al., 2016, 2018). La StLDP, comme la LDSP de *Nannochloropsis*, présente également un domaine d'interaction avec la protéine de l'autophagie ATG8 et pourrait donc contribuer à la dégradation des LD (Leyland et al., 2020a; Zienkiewicz et al., 2020). Un mutant KO de la StLDP a récemment été produit par un système CRISPR-Cas9 chez Pt1 (Taparia et al., 2022). Les diatomées mutantes présentent une ou deux grosses gouttelettes lipidiques en milieu riche et ont un profil d'acides gras appauvri en EPA et enrichi en C16:1 n-7 par rapport au *wt*. En milieu carencé, le mutant accumule plus de lipides qu'en milieu riche, mais l'augmentation est moins importante que pour le *wt* dans le même milieu. Les cellules de la souche KO y accumulent toujours une ou deux LD de diamètre important, tandis que les cellules du *wt* accumulent un plus grand nombre de petites LD. Surtout, une fois replacé en milieu riche après carence, la consommation des lipides est bien plus faible chez le mutant que chez le *wt*. En parallèle, après resupplémentation, la densité cellulaire du KO double, tandis que celle du *wt* est multipliée par 10 : la StLDP joue donc probablement un rôle dans la dégradation des LD, et son absence ralentit ce processus. L'accumulation de lipides en milieu riche pourrait refléter un blocage du *turnover* des LD (par lipolyse ou lipophagie) chez le mutant, et la présence de LD en petit nombre mais de fort volume suggère que la StLDP régule la taille et le volume de ces organites (Taparia et al., 2022). Une autre étude a également produit un mutant KO chez

Pt4 (Yoneda et al., 2023) qui présente un phénotype de diminution du nombre de LD et une augmentation de la taille de chaque LD, sans toutefois affecter le contenu en lipides neutres.

Il est à noter que la StLDP est une protéine de classe I tandis que la PtLDP1 est de classe II (Guéguen et al., 2021), suggérant une association plus forte de la StLDP avec les LD. Cela pourrait expliquer que la PtLDP1, faiblement ou transitoirement associée aux LD, n'ait pas été identifiée dans l'étude qui a découvert la StLDP. Cela ne permet cependant pas d'expliquer l'absence de la StLDP fortement associée aux LD dans l'étude qui a identifié la PtLDP1. Une hypothèse est la variation dans le temps des protéines majeures associées aux LD en fonction de la durée de carence, puisque la première étude a appliqué une carence de 2 jours contre 6 jours pour la seconde. Une autre hypothèse est une différence entre les écotypes de *P. tricornutum*, la StLDP ayant été décrite chez Pt7 tandis que la PtLDP1 a été décrite chez Pt1 (Yoneda et al. 2016, Wang et al. 2017). On peut aussi supposer que l'expression de ces protéines est exclusive dans le temps, l'une des deux étant présente quand l'autre ne l'est pas : une étude récente des transcrits de Pt4 au cours du temps pendant une carence en azote appuie cette hypothèse, en montrant qu'à partir du moment où commence la carence, le gène de la StLDP est progressivement sur-exprimé, tandis que dans le même temps, le gène de la PtLDP1 est progressivement sous-exprimé (Scarsini et al. 2022). Les rôles respectifs de chacune de ces deux protéines restent donc encore à élucider mais pourraient être liés à différentes étapes de réponse à un stress.

3.2.2.2 – *Les protéomes de gouttelettes lipidiques*

Avec les protéines majeures, nous avons vu que les protéines de LD n'ont pas uniquement un rôle structural mais également un rôle fonctionnel. Différentes études de protéomique ont été menées sur les LD de *P. tricornutum* (Yoneda et al., 2016; Wang et al., 2017; Lupette et al., 2019; Leyland et al., 2020b) ou sur d'autres modèles de straménopiles comme la diatomée *F. solaris* (Nojima et al., 2013; Nonoyama et al., 2019; Kaha et al., 2023). Ces études, toutes réalisées sur des LD produites par une carence azotée, ont démontré la présence d'une grande variété de protéines, bien que le nombre de protéines identifiées dans chaque étude varie fortement, avec 5 protéines chez Pt7 (Yoneda et al., 2016), 9 (Wang et al., 2017) ou 86 (Lupette et al., 2019) protéines chez Pt1, et 598 protéines chez Pt4 (Leyland et al., 2020b). Les méthodes de purification des LD, et en particulier les techniques de rupture cellulaire et de lavage, peuvent expliquer en partie ces différences, bien qu'il puisse aussi s'agir de différences liées au temps de culture en carence. Dans tous ces protéomes, on trouve des protéines assignées à la mitochondrie ou au plaste, probablement par contamination car, comme les LD établissent des sites de contact membranaires (MCS) avec de nombreux organites, leur purification est difficile (Maeda et al., 2017; Leyland et al., 2020a).

Certains groupes fonctionnels de protéines sont cependant retrouvés régulièrement dans les différents protéomes (**Figure 35**), suggérant un rôle fonctionnel pour les LD bien plus vaste qu'une simple fonction de stockage de lipides. Notons que les deux protéomes les plus "complets" contiennent tous deux les deux protéines majeures de LD de *P. tricornutum* (Lupette et al., 2019; Leyland et al., 2020b).

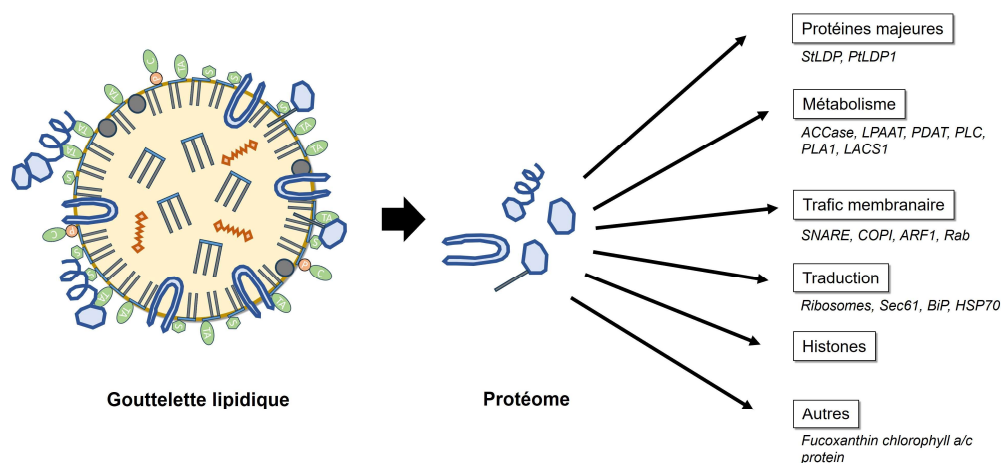


Figure 35 : Récapitulatif des différentes fonctions trouvées dans les protéomes de LD de *P. tricornutum*. ACCase : Acétyl-CoA Carboxylase, ARF1 : ADP Ribosylation Factor, COPI : Coat Protein 1, HSP70 : Heat Shock Protein 70, LACS1 : Long-chain Acyl-CoA Synthetase 1, LPAAT : Lysophosphatidic Acid Acyltransferase, PDAT : Phospholipide:Diacylglycérol Acyltransférase, PLA1 : Phospholipase A1, PLC : Phospholipase C, PtLDP1 : *P. tricornutum* Lipid Droplet Protein, SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor, StLDP : Stramenopile Lipid Droplet Protein.

• Protéines du métabolisme

On y trouve d'abord des enzymes impliquées dans différentes voies métaboliques comme la voie des pentoses-phosphate, la glycolyse, les mécanismes de CCM mais aussi la synthèse des acides gras avec l'ACCase (Lupette et al., 2019; Leyland et al., 2020b). L'étude chez Pt4 a mis en évidence d'autres enzymes du métabolisme des lipides comme une LPAAT, une PDAT et une phospholipase C. En outre, ce même protéome a montré la présence de protéines capables d'apporter des acyl-CoA et des glycérolipides pour la synthèse de TG comme une phospholipase A1, la LACS1 et une *acyl-CoA binding protein*, par ailleurs présente dans 2 des trois autres protéomes de *P. tricornutum* (Yoneda et al., 2016; Lupette et al., 2019).

- *Trafic membranaire*

Il y a aussi des protéines impliquées dans le trafic membranaire comme les coatomères COPI qui participent, en association avec la protéine ARF1 également trouvée dans les protéomes, au transfert de vésicules entre les feuillettes de l'appareil de Golgi et entre le Golgi et le RE. On y trouve des clathrines qui participent également à la formation de vésicules. Les protéines SNARE, nécessaires à la fusion des vésicules une fois arrivées à leur membrane cible, sont présentes (Lupette et al., 2019; Leyland et al., 2020b). On distingue les R-SNARE (R pour l'Arginine, ou v-SNARE pour *vesicle*) des Q-SNARE (Q pour la Glutamine, ou t-SNARE pour *target*). Les protéomes de LD contiennent les deux types de protéines SNARE. Ils contiennent aussi des GTPases Rab, protéines impliquées dans les interactions entre compartiments cellulaires. Toutes ces protéines pourraient être impliquées dans les déplacements de LD et leur interaction avec d'autres organites, dans le cadre de l'autophagie par exemple. Ces machineries protéiques sont d'ailleurs également présentes chez *F. solaris* (Nonoyama et al., 2019). En lien avec les protéines de trafic membranaire, on trouve aussi des protéines du cytosquelette comme des myosines ou des tubulines (Leyland et al., 2020b).

- *Traduction, modifications post-traductionnelles et contrôle du repliement protéique*

Les deux protéomes où les nombres de protéines sont les plus élevés (Lupette et al., 2019; Leyland et al., 2020b) montrent un grand nombre de protéines impliquées dans la traduction et les modifications post-traductionnelles. On y trouve ainsi des sous-unités de ribosomes et des facteurs d'élongation. Cela suggère une production possible de protéines directement dans la membrane des LD, ce qui est cohérent avec la présence du translocon Sec61 et de plusieurs de ses co-effecteurs comme la protéine BiP (Leyland et al., 2020b). D'autres protéines sont impliquées dans les modifications de ces protéines éventuellement produites sur place comme l'ubiquitination, la phosphorylation, la prénylation ou l'acylation.

Par ailleurs, des protéines chaperonnes impliquées dans le repliement protéique et des protéines de dégradation des protéines mal repliées ont également été identifiées. On trouve ainsi plusieurs *Heat Shock Proteins* (Hsp), dont notamment la Hsp70, et plusieurs protéines du protéasome (Yoneda et al., 2016; Lupette et al., 2019; Leyland et al., 2020b). La présence du protéasome pourrait également être liée au recyclage de l'azote dans la cellule qui a lieu pendant la carence (voir **partie 3.1.2.1**). La Hsp70 pourrait cependant avoir d'autres fonctions car elle est également impliquée dans l'autophagie, le décrochage des clathrines, ou même dans la surrégulation de la synthèse des lipides dans certaines cellules, comme les cellules de cancer du foie HepG2 (Zhang et al., 2018; Guéguen et al., 2021).

- *Histones et autres protéines fonctionnelles*

Enfin, un groupe de protéines fréquemment identifié dans les protéomes de LD est le groupe des histones (Yoneda et al., 2016; Lupette et al., 2019; Leyland et al., 2020b). Ces protéines sont connues pour servir au repliement des molécules d'ADN. Présentes en trop grand ou trop faible nombre dans la cellule, elles peuvent avoir des effets cytotoxiques (Leyland et al., 2020a). Leur stockage permettrait ainsi de réguler leur concentration. Il a également été mentionné une fonction dans l'interaction avec des acides nucléiques comme des ARNm (Zhang and Liu, 2019), ce qui est possible vu la présence de nombreux effecteurs de la traduction.

Enfin, une autre hypothèse suggère que les histones sont stockées comme protéines fonctionnelles pour les protéger de la dégradation importante qui a lieu pendant une carence en azote (Lupette et al., 2019). Cela permettrait de reprendre la croissance plus rapidement à l'issue du stress. Cette hypothèse permet aussi d'expliquer la présence de protéines de la photosynthèse autrement que par la contamination lors de la purification des LD.

Les protéines présentes suggèrent ainsi différentes fonctions pour les LD, outre le stockage de lipides : régulation du métabolisme, de la signalisation et du trafic cellulaire, production de protéines spécifiques à la situation de carence, séquestration de protéines toxiques et stockage temporaire de protéines fonctionnelles (Goold et al., 2015; Leyland et al., 2020a).

3.3 – La formation des gouttelettes lipidiques

Par analogie avec les modèles de levures et d'animaux, on considère en général que les LD sont formées chez les diatomées au niveau de sous-domaines du RE. Cependant, il a été montré chez les algues vertes comme *Chlamydomonas reinhardtii* que la formation des LD impliquait des interactions entre RE et plaste. Chez les diatomées, le RE est continu avec la membrane externe du plaste, ce qui rend les comparaisons difficiles avec d'autres modèles. Toutefois, les LD de *P. tricornutum* contiennent à la fois du SQDG (plastidial), de la PC (du RE), et du DGTA (formé dans le RE) contenant parfois du C16:2 n-4 (formé dans le plaste) comme chaîne d'acide gras, aux côtés d'une molécule d'EPA (formé dans le RE mais présent majoritairement dans le plaste). Il est ainsi possible de faire plusieurs hypothèses sur la zone de formation des LD (**Figure 36**) : ou bien au niveau de la cERM (membrane externe du plaste, continue avec le RE) qui fournirait les lipides provenant du plaste et du RE (**Figure 36A**) ; ou bien par des interactions entre la cERM (fournissant le SQDG) et d'autres parties du RE (fournissant PC et DGTA) (**Figure 36B**) (Guéguen et al., 2021).

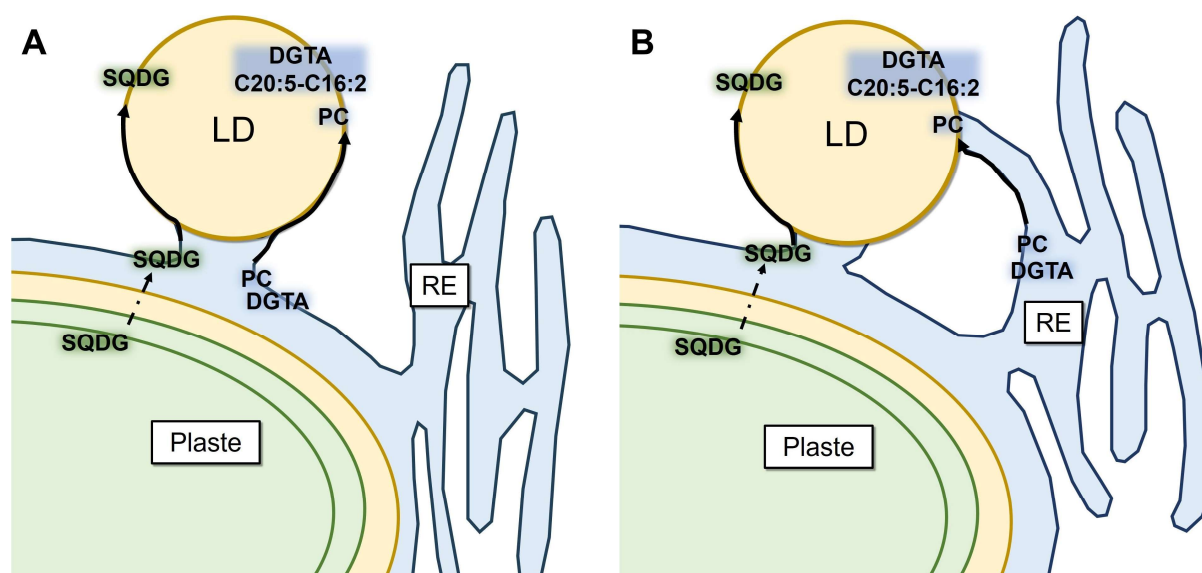


Figure 36 : Deux hypothèses pour la synthèse des LD chez *P. tricornutum*. A : Synthèse des LD au niveau de la cERM (chloroplastic Endoplasmic Reticulum Membrane). B : Synthèse des LD par des interactions entre la cERM et d'autres domaines du RE. (Adapté d'après Guéguen et al. 2021)
 DGTA : Diacylglycérol Hydroxyméthyltriméthyl- β -alanine, LD : Lipid Droplet, PC : Phosphatidylcholine, RE : Réticulum Endoplasmique, SQDG : Sulfoquinovosyl Diacylglycérol.

3.3.1 – Mécanismes généraux de formation

Les TG produits par les différentes voies métaboliques décrites en **partie 2** sont incorporés aux LD selon un mécanisme analogue à celui proposé chez d'autres eucaryotes qui suppose une production au niveau du RE. Ce mécanisme est compatible avec les deux hypothèses citées ci-dessus. Au niveau de sous-domaines précis du réticulum, les TG commencent par s'accumuler en un renflement entre les deux couches de la membrane. En parallèle, à ce site, la membrane est enrichie en certaines espèces de lipides polaires, ce qui modifie localement la courbure de la membrane et la tension de surface. Ceci permet un bourgeonnement du feuillet externe de la membrane du RE là où s'accumulent les TG, donnant une LD (**Figure 37**).

Le changement de composition local en lipides polaires peut être induit par la présence de protéines particulières au niveau de ces sous-domaines du RE. Une protéine en particulier, la seipine, est cruciale dans la genèse des LD et on la trouve au niveau des sites de formation de LD. C'est une protéine transmembranaire qui peut former des oligomères motiles dans les membranes du RE. Ces oligomères s'arrêtent aux sites de formation des LD (Santinho et al., 2020). Leur structure en canal permet une stabilisation de la jonction entre la LD en cours de remplissage et la membrane du RE. De plus, cette structure permet le transport unidirectionnel des TG depuis le RE vers la LD (Guéguen et al., 2021). La seipine pourrait réguler la composition locale en lipides polaires et favoriser le bourgeonnement des LD, tout en interagissant avec les protéines de synthèse des TG (Santinho et al., 2020; Guéguen et al., 2021).

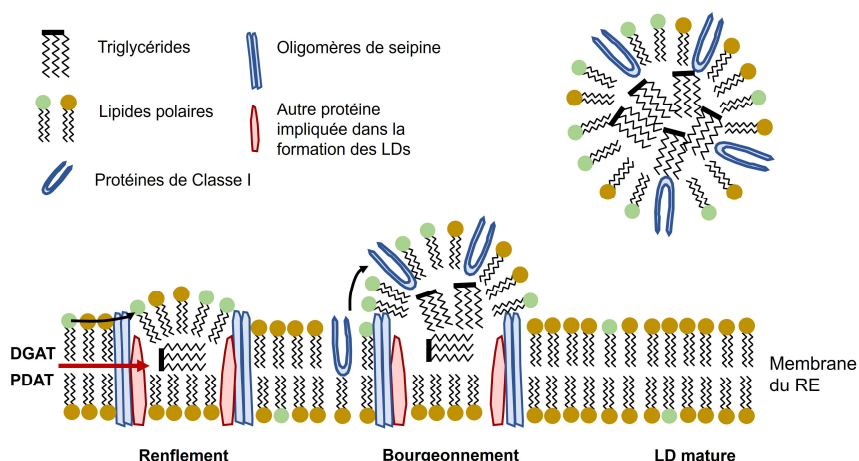


Figure 37 : Le mécanisme général de formation des gouttelettes lipidiques dans la cellule. L'hypothèse de gouttelettes lipidiques (LD) qui se détachent du réticulum endoplasmique (RE) est représentée ici. Les lipides polaires à tête verte correspondent aux lipides polaires enrichis dans la membrane des LD. DGAT : Diacylglycérol Acyltransférase, PDAT : Phospholipide:Diacylglycérol Acyltransférase.

Un homologue de la seipine (Phatr3_J47296) a été identifié chez *P. tricornutum* (Lu et al., 2017). Sa sur-expression conduit à une accumulation de lipides neutres, une augmentation de la proportion en acides gras saturés au détriment des acides gras insaturés et une augmentation du nombre et du diamètre des LD. Cela suggère donc bien un rôle de la seipine dans la formation des LD, mais également une fonction comme régulateur de la synthèse des lipides (Lu et al., 2017). Une sur-expression de ce gène de seipine putative a été observée pendant une carence azotée chez Pt4 (Scarsini et al., 2022).

Outre la seipine, d'autres protéines peuvent être impliquées dans l'initiation de la formation des LD. Par exemple, on trouve dans les cellules de mammifères la GTPase Rab18, dont la fonction est de stabiliser la jonction entre LD et ER à travers une interaction avec des protéines Q-SNARE (Syntaxine11, Use1, BNIP1) et le complexe de protéines NRZ (NAG, RINT1, ZW10) (Xu et al., 2018). La protéine Rab18 a été identifiée dans un protéome de LD chez Pt4, ainsi que les complexes TRAPP1 et COPI (Leyland et al., 2020b), dont l'interaction sert au recrutement de Rab18 à la surface des LD dans les cellules de mammifères (Li et al., 2017).

Une fois remplies, les LD peuvent être détachées de leur site de formation ou y rester associées. On ne sait cependant pas ce qu'il en est chez les diatomées. Des LD attachées au RE pourraient continuer d'échanger des protéines avec celui-ci. Des LD détachées continuent parfois leur croissance du fait de la présence de protéines comme des DGAT ou des GPAT dans leur membrane, mais ça ne semble pas être le cas chez Pt1 où ces enzymes n'ont pas été identifiées (Lupette et al., 2019; Jaussaud et al., 2020). Chez Pt4, un nombre plus important d'enzymes du métabolisme des lipides a été détecté dans les LD (voir la **Partie 3.2.2.2**), et il semblerait qu'elles soient actives car le diamètre des LD augmente tout au long de la carence (Leyland et al., 2020b). Chez certains organismes, les LD peuvent également interagir ou fusionner entre elles, échangeant notamment des TG. Cependant, de tels phénomènes n'ont pas été détectés chez la souche Pt1 pendant une carence en azote (Jaussaud et al., 2020).

3.3.2 – L'adressage des protéines chez les diatomées

Nous avons vu que les LD ne contiennent pas uniquement des LN, mais également des protéines. En parallèle, un grand nombre de protéines extérieures aux LD sont impliquées dans la dynamique de ces organites, que ce soit par la synthèse des TG, la stabilisation de leur formation, ou leur dégradation. Cette dynamique implique de nombreux compartiments cellulaires et suppose donc des mécanismes d'assignement et de transport des protéines vers ceux-ci.

3.3.2.1 – Les séquences signal

D'une façon similaire à ce qui se passe chez les autres familles d'eucaryotes, l'adressage des protéines à des organites chez les diatomées se fait souvent par des séquences-signal spécifiques de l'organite en question : noyau, mitochondrie, RE, péroxysome ou plaste. Cela permet de prédire par bioinformatique la localisation d'une protéine à partir de sa séquence d'acides aminés. Des algorithmes ont été développés à cet effet comme HECTAR ou ASAFind (Gschloessl et al., 2008; Gruber et al., 2015).

Cependant, le plaste étant contenu dans le RE chez les diatomées, un signal plus complexe existe pour adresser les protéines au plaste. Il est constitué d'une séquence en deux parties nommée Signal d'Adressage Bipartite (*Bipartite Targeting Signal*, **Figure 38**) dont la première partie permet l'adressage de la protéine vers le RE, et la seconde permet l'import dans le plaste à travers les trois membranes restantes (Huesgen et al., 2013; Lau et al., 2015). Le signal d'adressage comporte un motif conservé ASAFAP dont 3 acides aminés sont présents dans la première partie et les 3 autres dans la seconde partie. La présence de la phénylalanine (F) ou d'un autre acide aminé aromatique, est nécessaire pour l'import dans le stroma du plaste (Gruber et al., 2015).

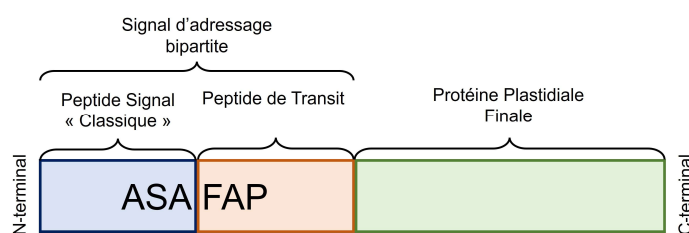


Figure 38 : Topologie du signal d'adressage bipartite des protéines plastidiales de diatomées.

3.3.2.2 – Le transport des protéines vers le réticulum endoplasmique ou le plaste

Le fonctionnement du mécanisme d'import des protéines vers le plaste complexe implique 3 systèmes protéiques principaux (**Figure 39**). Le premier est le complexe de translocation Sec61 présent dans la membrane du RE qui s'associe avec des co-effecteurs et les ribosomes, ce qui permet la synthèse des protéines non repliées directement dans la lumière du RE plutôt que dans le cytosol. C'est également la voie empruntée par les protéines assignées au RE. Le peptide signal d'assignation au RE est alors coupé par une protéase, et la seconde partie de la séquence permet l'import vers le plaste (Huesgen et al., 2013).

C'est dans la PPM que le deuxième système d'import entre en jeu. Les protéines qui le constituent sont homologues à celles d'une voie de dégradation des protéines mal repliées dans le RE : l'*Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation* (ERAD). Cette

machinerie protéique sert au retour de protéines mal repliées depuis le RE vers le cytosol, où elles sont poly-ubiquitinées puis dégradées par le protéasome (Lau et al., 2015). Ce système contient plusieurs enzymes comme les derlines (canaux protéiques), les enzymes d'ubiquitination E1, E2 et E3, ainsi qu'un complexe ATPase Cdc48. Chez les diatomées, ces enzymes existent en deux exemplaires, l'un issu du génome de la diatomée qui sert de machinerie ERAD, et l'autre issu du génome de l'algue rouge endosymbionte secondaire. Ce deuxième jeu d'enzymes est localisé dans la PPM ou dans le PPC, c'est-à-dire le cytosol réduit du symbionte. Il est impliqué dans l'import des protéines à travers la PPM, dans un système nommé *Symbiont-specific ERAD-like machinery* (SELMA). L'interaction des derlines avec le signal de la protéine permet de traverser la PPM moyennant l'ubiquitination des lysines localisées en N-terminal (Lau et al., 2015). Par ailleurs, le réseau vésiculaire présent dans le PPC pourrait également jouer un rôle dans le passage de la PPM par des protéines, notamment des protéines repliées ou bien ayant subi des modifications post-traductionnelles (Flori et al., 2016).

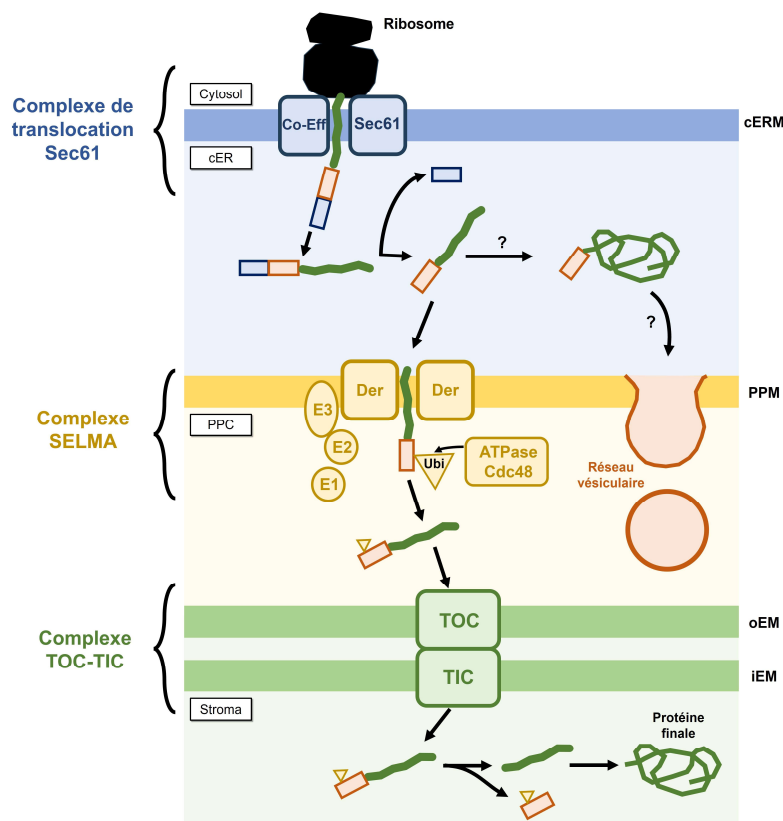


Figure 39 : Les différents systèmes d'imports de protéines dans le plaste des diatomées. *cER* : chloroplastic Endoplasmic Reticulum, *Der* : Derlins, *iEM* : inner Enveloppe Membrane, *oEM* : outer Enveloppe Membrane, *PPM* : Periplastidial Membrane, *SELMA* : Symbiont-specific ERAD-like Machinery, *TIC* : Translocon on the Inner Chloroplast membrane, *TOC* : Translocon on the Outer Chloroplast membrane, *Ubi* : Ubiquitin.

Enfin, le troisième système d'import est similaire à celui qui a lieu dans les plastes simples. Il se fait par l'action conjointe des protéines TOC (*Translocon on the Outer Chloroplast membrane*) et TIC (*Translocon on the Inner Chloroplast membrane*) (Scarsini et al., 2019).

Malgré ces mécanismes bien connus qui reposent sur la séquence de la protéine, une étude de caractérisation d'une DGAT2 (Thaps3_25595) de la diatomée *T. pseudonana* (Manandhar-Shrestha and Hildebrand, 2015) a montré que pendant une carence en azote, cette DGAT2 changeait de localisation subcellulaire. Pendant la phase exponentielle de croissance (donc sans accumulation de LN), la protéine était localisée dans le plaste, mais elle se trouvait exclusivement dans le RE pendant la phase stationnaire, de manière concomitante avec l'apparition des LD (Manandhar-Shrestha and Hildebrand, 2015). Cette DGAT2 pourrait donc avoir un rôle dans la biosynthèse des TG, et donc des LD. Toutefois le mécanisme qui permet une assignation tantôt au RE, tantôt au plaste reste inconnu.

3.3.2.3 – *L'association des protéines avec les gouttelettes lipidiques*

L'adressage des protéines vers les LD suit des mécanismes encore moins bien définis. Les protéines associées aux LD présentent souvent une structure en hélice- α amphipathique, ce qui permet leur liaison à la membrane des LD comme décrit plus haut (voir la **partie 3.2.2**). D'autres structures pourraient également permettre une association avec les LD, comme un domaine hydrophobe central. C'est le cas de certaines protéines majeures de LD comme les oléosines des plantes, la StLDP de *P. tricornutum*, ou la LDSP de *Nannochloropsis* (Yoneda et al., 2016). Cependant, un domaine hydrophobe central n'est pas nécessaire pour l'ancrage des protéines majeures de LD car d'autres protéines de ce type, comme la PtLDP1 de *P. tricornutum*, la HOGP (*Haematococcus Oil Globule Protein*) d'*Haematococcus lacustris*, la MLDP (*Major Lipid Droplet Protein*) de *Dunaliella salina*, ou la DOAP1 (*Diatom Oleosome Associated Protein*) de la diatomée *Fistulifera sp.* n'en possèdent pas.

La présence de régions enrichies en proline semble également jouer un rôle dans l'ancrage entre la protéine et la membrane de la LD. Les oléosines et caléosines de plantes ont des "noeuds de proline" (*proline knots*) qui les ancrent à la monocouche lipidique (Leyland et al., 2020a) tandis que la DOAP1 et la PtLDP1 comprennent un domaine riche en proline (Maeda et al., 2014; Wang et al., 2017). D'autres résidus d'acides aminés, pouvant être des sites de modifications post-traductionnelles, semblent également jouer un rôle. C'est le cas des cystéines dont la fonction thiol peut recevoir une chaîne prényl ou acyl qui permet ensuite un ancrage à la membrane des LD. En utilisant deux méthodes de prédiction différentes, il a été montré qu'environ 50% des protéines de LD identifiées chez Pt4 étaient possiblement palmitoylées, ou plus généralement acylées (Leyland et al., 2020b).

La structure des protéines majeures de LD doit également jouer un rôle dans leur adressage et possiblement dans leur fonction. La HOGP d'*Haematococcus* exprimée de manière hétérologue chez *P. tricornutum* conduit à une localisation dans les LD et augmente l'accumulation des TG pendant un stress azoté (Shemesh et al., 2016). La LDSP de *Nannochloropsis* a également été exprimée de manière hétérologue, mais chez un mutant d'*Arabidopsis* sans oléosine. Cette expression permet de restaurer partiellement le phénotype du *wt* et la LDSP est localisée dans les LD (Vieler et al., 2012). Enfin, un indice supplémentaire que la structure générale sert à la localisation vers les LD a été démontré chez *F. solaris*, où la séquence complète de la DOAP1 fusionnée avec la GFP conduit à une fluorescence verte dans les LD (Nojima et al., 2013), tandis que la protéine de fusion ne comptant que la séquence signal de la DOAP1 fusionnée avec la GFP conduit à une fluorescence verte dans le RE (Maeda et al., 2014).

La présence d'une hélice α amphipathique, de domaine hydrophobe et/ou riches en proline, de résidus cystéine pouvant être acylés sont autant de mécanismes qui, probablement combinés, permettent l'adressage (transitoire ou permanent) de protéines vers les LD pendant leur bourgeonnement, leur remplissage ou leur durée de vie dans le cytosol.

3.3.3 – La formation de populations de gouttelettes lipidiques

Les LD sont ainsi formées par accumulation de LN auxquels viennent s'ajouter des protéines. Suivant l'espèce de diatomée considérée, le nombre et la taille des LD varient fortement. *T. pseudonana* accumule ainsi entre 3 et 5 LD de 0,3 à 1,5 μm de diamètre, *Pseudo-nitzschia multiseriata* entre 6 et 15 de 0,7 à 1,4 μm de diamètre et *F. solaris* en accumule 2 de diamètre variant entre 1,3 et 5,6 μm (Maeda et al., 2017).

Chez *P. tricornutum*, il semble y avoir une variabilité de nombre et de diamètre suivant les écotypes. En particulier, Pt1 est rapportée comme présentant de multiples petites LD, tandis que Pt4 présenterait une ou deux LD de grande taille (Jaussaud et al., 2020; Leyland et al., 2020b; Scarsini et al., 2021).

3.3.3.1 – La dynamique de formation

Plusieurs études ont examiné l'évolution de l'apparence des LD de différents écotypes et souches de *P. tricornutum* au cours du temps par des techniques de microscopie (**Figure 40**).

Une étude a cherché à comparer les stratégies de stockage des lipides chez *P. tricornutum* (Pt4) et l'algue verte *Tetraselmis suecica* (Wong and Franz, 2013). Les auteurs ont observé les cellules de *P. tricornutum* pendant une période de 63 jours. Ils ont observé que Pt4 présentait 1 ou 2 LD dont la taille augmente au cours du temps et que les LD ne sont plus sphériques en phase stationnaire car elles sont contraintes par la paroi de la cellule. Les auteurs émettent l'hypothèse que chez *P. tricornutum*, les lipides néo-synthétisés rejoignent

une (ou quelques) LD déjà présentes dans le cytosol plutôt que d'être utilisés pour former de nouvelles LD (Wong and Franz, 2013). Une autre étude chez Pt4 a trouvé des résultats similaires, avec une ou deux LD qui augmentent en diamètre au fur et à mesure d'une carence de 7 jours (Leyland et al., 2020b).

D'autres études ont observé la dynamique des LD pendant une carence. Sur la souche FACHB-863 originaire de Chine (dont on ne connaît pas l'écotype), les LD ont été mesurées pendant 7 jours de carence en azote par comparaison avec les cellules cultivées en milieu contenant de l'azote (Yang et al., 2013). Les résultats montrent des LD de taille similaire entre les deux conditions, dont le diamètre varie de 0,2 à 2,0 μm . L'accumulation des TG pour les cellules du milieu carencé s'explique par un nombre plus important de LD (Yang et al., 2013). Une étude sur la souche Pt1 8.6 a montré que pendant une croissance de 2 jours et demi (60 heures) après l'épuisement des nitrates dans le milieu, les LD sont initialement nombreuses et petites, et que leur nombre diminue tandis que leur diamètre augmente au cours du temps, jusqu'à perdre leur forme sphérique contre la paroi des cellules (Ge et al., 2014). Ces observations décrivent donc plusieurs stratégies d'accumulation, peut-être dépendantes des souches ou écotypes concernés.

Enfin, une étude chez Pt1 a caractérisé une autre dynamique d'apparition des gouttelettes pendant une carence en azote de 7 jours (Jaussaud et al., 2020). Une première population (P1) de LD apparaît dans les trois premiers jours de carence et atteint un diamètre médian de 1,2 μm . Au jour 4, une seconde population (P2) et une troisième population (P3) de petites LD apparaissent (0,2 μm de diamètre) et atteignent respectivement 0,3 μm et 0,6 μm de diamètre médian au jour 7. Une telle observation suppose un remplissage des LD qui s'arrête une fois la gouttelette mature. Cela suppose aussi une limitation de la production de lipides par l'espace disponible dans la cellule, ce que les auteurs ont montré en constatant une augmentation de la taille des populations P1 et P3 chez un mutant de *P. tricornutum* à grandes cellules, tandis que la taille de la population P2 reste constante. Là encore, il semble donc y avoir une différence importante entre Pt1 et Pt4. Cela pourrait être lié à la présence d'enzymes de la biosynthèse des lipides dans le protéome de LD de Pt4 mais pas de Pt1 (Lupette et al., 2019; Leyland et al., 2020b).

L'existence de telles sous-populations pourrait indiquer différentes étapes dans l'accumulation des lipides, par exemple des mécanismes différents comme une production *de novo* initiale, suivie d'un recyclage des lipides de membrane ou du carbone fixé dans d'autres molécules. L'étude ayant identifié la StLDP a souligné deux phases dans l'accumulation de LD, une première phase où la StLDP est sur-exprimée jusqu'à 3 ou 4 jours, puis une seconde phase où l'expression a diminué mais reste ensuite à un niveau constant (Yoneda et al., 2016). À

l'appui de mécanismes de remplissage différents, l'apparition de la population P1 coïncide avec une augmentation en concentration des lipides neutres et des lipides polaires, tandis que l'établissement des deux autres populations se fait en même temps qu'une diminution des taux de lipides polaires (Jaussaud et al., 2020).

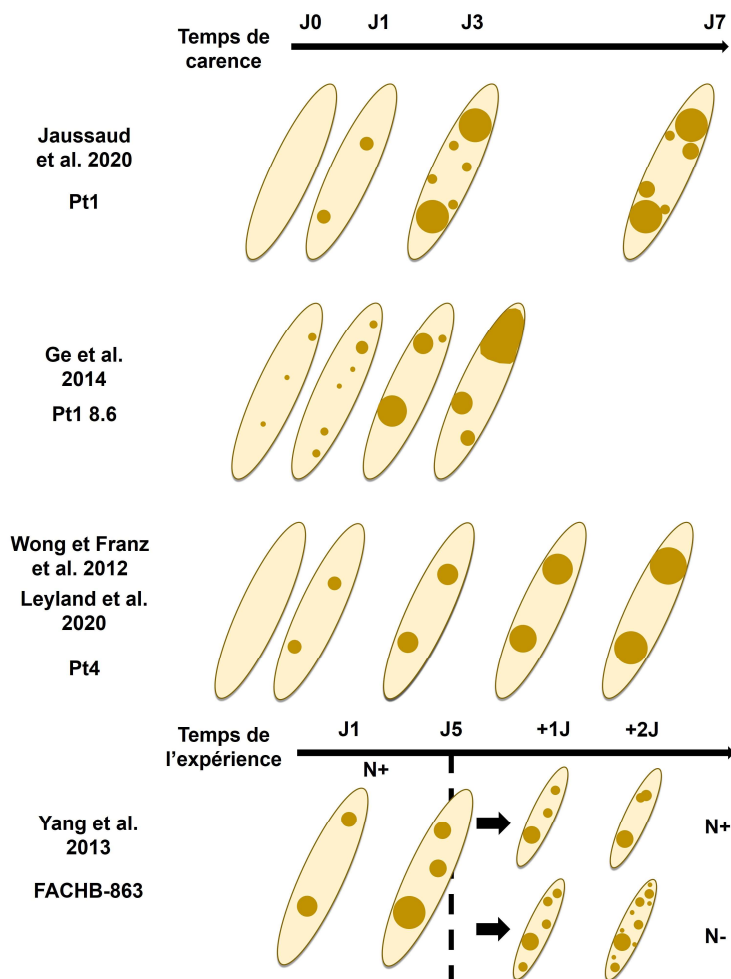


Figure 40 : Différentes stratégies d'accumulation de gouttelettes lipidiques au cours d'une carence en azote chez différentes souches de *P. tricornutum*.

3.3.3.2 – L'origine des lipides présents dans les gouttelettes

Une question concomitante à la dynamique de formation des LD est celle de l'origine des acides gras qui sont incorporés dans les TG. Les acides gras peuvent être synthétisés *de novo* ou bien être issus du recyclage d'autres lipides, comme ceux des membranes photosynthétiques par exemple.

Comme la plupart des gènes de synthèse de lipides *de novo* sont sous-régulés ou non régulés différemment pendant une carence en azote (voir la **partie 3.1.2.4**), il paraît probable qu'une part importante des acides gras présents dans les lipides de LD soient issus du

recyclage. Ceci est en plus corroboré par la sur-expression d'enzymes comme la PDAT ou les phospholipases C et D.

L'existence d'un recyclage des lipides de membranes au profit des lipides neutres a été montrée dans une expérience de carence azotée où la concentration totale de l'EPA ne variait pas au cours du temps mais qu'une part de plus en plus grande de cet acide gras était retrouvée dans la fraction des TG_(Remmers et al., 2017). Une autre étude a suivi le volume des LD et du plaste chez la diatomée *F. solaris* pendant une carence en nutriments (Liang et al., 2015). Les résultats montrent que pendant les premières 72 heures de carence, la diminution de volume du plaste ($24 \mu\text{m}^3$) est équivalente à l'augmentation de volume de LD ($23 \mu\text{m}^3$) suggérant un recyclage des lipides du premier pour remplir les secondes. Toutefois, au-delà de 72h, le volume du plaste ne diminue plus mais reste constant tandis que les LD continuent de croître. Cependant, la carence en nutriments dans le milieu n'arrête pas immédiatement le cycle cellulaire puisqu'une division cellulaire se produit après changement de milieu. Une analyse lipidomique a de plus montré que les différentes classes de lipides polaires (de même que le volume du plaste) diminuent fortement au moment de la division cellulaire puis se stabilisent. Les auteurs suggèrent donc que ce serait plutôt une synthèse *de novo* par la voie de Kennedy, suite à la division, qui permettrait l'accumulation des TG. Cette étude montre toutefois également un passage de l'EPA depuis le MGDG plastidial vers les TG (Liang et al., 2015).

Cependant, ces expériences ne permettent pas de quantifier l'importance relative de la voie de production *de novo* ou de la voie issue du recyclage d'autres lipides. Au moins deux études rapportent les résultats d'expériences de suivi d'isotopes du carbone, apportés via du bicarbonate de sodium marqué, chez des diatomées. La première a été faite chez la diatomée *Cyclotella cryptica* pendant une carence en silice (Roessler, 1988). Cette étude a suivi à la fois la proportion de lipides synthétisés *de novo* à partir de la photosynthèse, et la proportion de lipides synthétisés à partir des squelettes carbonés d'autres molécules comme les protéines et les glucides. Les résultats montrent que pendant les 12 premières heures de carence en silice, 32 à 45% des lipides produits sont issus du recyclage d'autres molécules, ce qui donne entre 55 et 68 % de lipides issus d'une biosynthèse *de novo*.

La seconde étude est plus récente et a été réalisée chez *P. tricornutum* Pt1 (Burrows et al., 2012). Les résultats montrent que la synthèse *de novo* de lipides (principalement de TG) correspond à 60% du total des lipides synthétisés pendant 3 jours de carence en azote. Ces 60% peuvent inclure aussi bien des TG synthétisés à partir de la fixation du carbone par la photosynthèse résiduelle, que d'autres lipides (comme la PC) synthétisés *de novo*, puis recyclés pour donner des chaînes d'acides gras aux TG.

OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

Les données bibliographiques examinées ici montrent que le métabolisme des lipides de *P. tricornutum* a été étudié de manière large, en particulier pour ce qui est de la synthèse des lipides neutres et des conditions de stress conduisant à leur accumulation.

Ainsi, souvent dans une optique d'obtention de souches présentant une productivité élevée en lipides d'intérêt par rapport aux souches sauvages, de nombreuses études de génomique fonctionnelle ont été menées sur *P. tricornutum* ou d'autres diatomées. Ces études ont également contribué à élucider les voies métaboliques existant dans les cellules. La réorientation de ces voies en conditions de stress a également été décrite en détail par des études de la photosynthèse, de biochimie et d'approches « omiques ».

Si l'on considère les domaines moins abordés par la littérature, plusieurs zones d'ombre importantes demeurent dans notre compréhension du métabolisme des lipides chez *P. tricornutum*, chez les diatomées, ou même chez les microalgues en général. Ainsi, le transport des lipides à l'intérieur des cellules demeure majoritairement non caractérisé, les enzymes et processus impliqués dans le catabolisme des TG ne sont que peu ou pas identifiés, et les mécanismes relatifs à la formation et à la dynamique des LD sont peu connus, notamment quant aux organites impliqués et à la localisation subcellulaire des différents processus métaboliques.

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier *P. tricornutum*, car cette espèce présente de nombreux atouts pour l'étude du métabolisme et des stress nutritifs. Tout d'abord, elle possède un génome séquencé et surtout bien annoté. Ensuite, *P. tricornutum* étant un modèle communément employé, de nombreux résultats ont été obtenus chez cette espèce ce qui offre une base de comparaison importante pour nos propres expériences. Enfin, cette espèce présente l'avantage parmi les diatomées de ne pas nécessiter de silice, ce qui retire un facteur de stress potentiel par rapport aux autres diatomées.

L'examen de la littérature a montré que différents écotypes de *P. tricornutum* étaient étudiés suivant les études. L'écotype Pt1 est le plus fréquemment étudié, souvent à travers la souche 8.6 qui a servi pour le premier séquençage du génome. Toutefois, les écotypes Pt3, Pt4 et Pt7 ont également souvent été étudiés. Ces études ont permis d'observer qu'il semblait y avoir une variabilité du phénotype d'accumulation des LD entre les écotypes de *P. tricornutum*, en particulier entre Pt1 et Pt4. Les études sur Pt1 décrivent ainsi une accumulation de LD nombreuses, tandis que les études sur Pt4 décrivent une accumulation sous forme d'une seule ou de deux LD. Des analyses génomiques ont en outre permis de souligner que la souche Pt4 montrait de fortes différences avec l'ensemble des autres écotypes considérés à ce jour, bien qu'aucun marqueur génétique spécifique du métabolisme des lipides, présentant des différences entre les deux souches, n'ait été caractérisé à ce jour. Les différences entre les

écotypes de *P. tricornutum* restant ainsi peu caractérisées, nous avons choisi d'étudier à la fois Pt1 et Pt4 pour ce travail de thèse.

L'un des aspects du métabolisme ayant été les moins étudiés chez *P. tricornutum* est la dégradation des lipides. Une méthode classique chez les microalgues pour induire cette dégradation est de mettre en place une expérience de resupplémentation où la culture est d'abord carencée avant de recevoir un ajout de nutriments. Peu d'expériences suivant ce type de protocole ont été menées chez *P. tricornutum* (Valenzuela et al., 2013; Jallet et al., 2020; Scarsini et al., 2022; Taparia et al., 2022), avec un suivi de quelques paramètres que sont en général la densité cellulaire, le taux de lipides neutres (estimé par la fluorescence du Nile Red) et le taux de chlorophylle. Elles montrent une reprise de croissance, une production de chlorophylle ainsi qu'une consommation des lipides. Toutefois, les mécanismes de consommation des lipides, la localisation dans la cellule de cette consommation, et les effets de la resupplémentation sur d'autres composés biochimiques comme les glucides ou les protéines restent à décrire.

Ainsi, nous avons étudié la réponse de *P. tricornutum* à une resupplémentation après une carence azotée. L'objectif était de caractériser, chez les écotypes Pt1 et Pt4, la formation et le devenir des gouttelettes lipidiques, l'évolution de la composition biochimique de la cellule, ainsi que de d'identifier les gènes et processus moléculaires impliqués dans cette réponse.

Pour répondre à cet objectif, une combinaison de méthodes a été mise en œuvre. Un protocole de culture en milieu carencé pendant 11 jours suivi d'une resupplémentation pendant 3 jours a été établi. Puis un suivi comparatif utilisant différentes méthodes de microscopie a été mené sur des cultures de *P. tricornutum* Pt1 et Pt4, permettant d'observer la dynamique d'apparition et de dégradation de LD chez les deux souches pendant un stress azoté suivi d'une sortie de carence (Chapitre III.1). Afin de compléter ces observations, une approche de suivi de l'expression de transcrits clés du métabolisme a été considérée. Cependant, les connaissances relatives à la dégradation des lipides chez les diatomées étant faibles, il a d'abord fallu identifier des gènes pouvant être impliqués dans ces processus. C'est pourquoi une analyse de criblage dans des jeux de données bioinformatiques a été menée pour identifier des gènes candidats à une fonction lipase (Chapitre III.2). Une fois ces gènes identifiés, des méthodes de biochimie et de quantification des transcrits (RT-qPCR) ont été mises en œuvre pour suivre, en carence et sortie de carence, à la fois la composition de la biomasse et l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des glucides de réserve (Chapitre III.3). Enfin, un essai de traitement par inhibiteurs des mécanismes de dégradation des lipides a été mené pour déterminer l'importance relative de la lipolyse et de la lipophagie (Chapitre III.4).

II – MATÉRIEL & MÉTHODES

1 – Matériel biologique et méthodes de culture

1.1 – Souches de *Phaeodactylum tricornutum*

Deux souches de *P. tricornutum* ont principalement été étudiées dans ce travail de thèse, une de l'écotype de référence Pt1 (CCMP 2561) isolé originellement au large de Blackpool au Royaume-Uni et une de l'écotype Pt4 (UTEX 646), isolé originellement sur l'estran rocheux de l'île de Segelskär en Finlande. Ces deux écotypes sont majoritairement fusiformes en culture ce qui facilite leur comparaison (**Figure 41**).

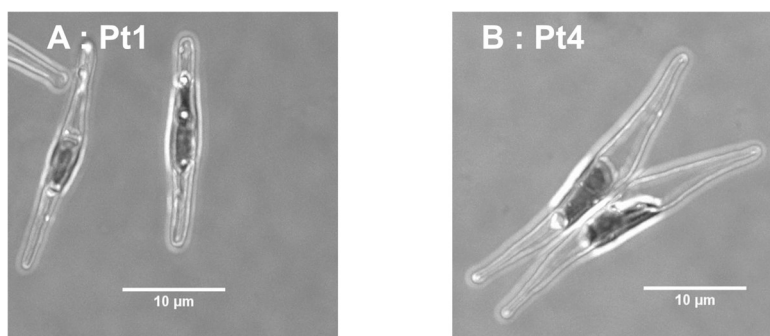


Figure 41 : Micrographies obtenues en microscopie confocale (lumière transmise) des écotypes Pt1 (A) et Pt4 (B).

Une troisième souche a été utilisée pour comparer la physiologie photosynthétique des écotypes. C'est une souche de l'écotype Pt1 maintenue au Key laboratory of Algal Biology de l'institut chinois d'hydrobiologie à Wuhan (Pr. Hanhua Hu), désignée ici Pt1_Wuhan (voir **section III-1.3**).

1.2 – Dispositifs et milieux de culture

Les cultures de *P. tricornutum* ont toutes été maintenues en milieu de culture f/2 (Guillard and Ryther, 1962), un milieu correspondant à une eau de mer artificielle ou naturelle stérilisée (par filtration ou autoclavage) à laquelle sont ajoutés des compléments nutritionnels. Dans ce travail, une eau de mer artificielle a été employée. La composition du milieu et des compléments est donnée dans le **tableau IV**. Un volume de 7,5 mL/L d'une solution de bicarbonate de sodium à 8% (w/V) a été ajouté au moment de la mise en culture pour éviter une limitation de la croissance par le carbone (Heydarizadeh et al., 2019).

Les cultures ont été menées en Erlenmeyers de 1L (500 mL de milieu) ou de 500 mL (200 mL de milieu) suivant les expérimentations, avec une agitation manuelle quotidienne à heure fixe et à une température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Suivant les expérimentations, l'éclairage a été apporté par des LED blanches (Chapitre III.3 et III.4) ou bien par des tubes fluorescents (Chapitre III.1) à des intensités qui varient également suivant les expérimentations entre $55 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ et $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ mesurée à l'aide d'un quantum-mètre LI-250A relié à une sonde LI-190R (LI-COR Biosciences).

Tableau IV : Composition du milieu de culture f/2 utilisé

Milieu eau de mer f/2		
Eau de mer artificielle	À ajouter pour 1 L de milieu	Concentration dans le milieu
Eau ultra pure	qsp 1 L	
NaCl	27 g	460 mM
MgSO ₄ 7 H ₂ O	6,6 g	27 mM
MgCl ₂ 6 H ₂ O	5,6 g	28 mM
CaCl ₂ 2 H ₂ O	1,5 g	10 mM
KNO ₃	1 g	9,9 mM
KH ₂ PO ₄	0,07 g	0,514 mM
NaHCO ₃	0,04 g	0,476 mM
Tampon TRIS pH=7,6 1M	20 mL	20 mM
Compléments	À ajouter pour 1 L de milieu	Concentration dans le milieu
NaNO ₃ 75 g/L	1 mL	0,882 mM
NaHPO ₄ 2H ₂ O 5 g/L	1 mL	0,032 mM
Na ₂ SiO ₃ 9 H ₂ O 30 g/L	1 mL	0,106 mM
Solution de métaux trace	1 mL	voir ci-dessous
Vitamines	0,5 mL	voir ci-dessous
Métaux trace	Concentration dans le complément	Concentration finale dans le milieu
FeCl ₃ 6 H ₂ O	11,65 mM	0,0117 mM
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	11,71 mM	0,0117 mM
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,039 mM	0,039 µM
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,026 mM	0,026 µM
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,077 mM	0,077 µM
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0,042 mM	0,042 µM
MnCl ₂ 4 H ₂ O	0,910 mM	0,910 µM
Vitamines	Concentration dans le complément	Concentration finale dans le milieu
Thiamine HCl (B1)	0,593 mM	0,593 µM
Biotine (B8)	4,09 µM	4,09 nM
Cobalamine (B12)	0,73 µM	0,73 nM

1.3 – Mise en œuvre des expériences de carence azotée et de resupplémentation nutritive

Dans toutes les expériences, les diatomées ont d'abord été inoculées à une densité de 10⁵ cellules/mL puis pré-cultivées en milieu f/2 standard pendant 7 jours (fin de la phase exponentielle, ~5.10⁶ cellules/mL) avant d'être soumises à une carence azotée. Les cultures ont été centrifugées (1200 x g, 15 min) puis lavées deux fois avec un milieu sans azote (N₀). Celui-ci est composé du milieu f/2 où le KNO₃ est remplacé par du KCl et où le complément en NaNO₃ n'est pas ajouté. Les microalgues sont ensuite cultivées en milieu N₀ avec ajout de bicarbonate. Pour les expériences de carence azotée, les microalgues ont été cultivées pendant 15 jours.

Les études de resupplémentation en azote ont été menées après 11 jours de carence azotée par ajout d'une quantité suffisante de nitrate de sodium (N+) et un suivi sur 72 heures. Des expériences additionnelles ont également ajouté du bicarbonate de sodium (C+) dans le milieu, définissant 4 conditions : N+C+ ; N-C+ ; N+C- ; N-C-. Les concentrations apportées ont été calculées à partir des valeurs maximales fournies par une étude ayant modélisé le métabolisme des lipides de *P. tricornutum* à l'échelle du génome (Levering et al., 2016) où une culture à une concentration de $13 \cdot 10^6$ cellules/mL consomme au maximum 1,57 mM de carbone et 0,535 mM d'azote pendant 14 heures d'illumination. Les conversions pour obtenir la masse de chaque complément à ajouter dans notre expérience sont indiquées dans le **tableau V**.

Tableau V : Conversions pour calculer les quantités de complément à ajouter au milieu

Complément	Concentration élémentaire	Concentration élémentaire massique	Concentration massique	Quantité à ajouter lors de la resupplémentation
NaNO ₃	0.535 mM _N	7.49 mg _N /L	45 mg _{NaNO₃} /L	6 µg/10 ⁶ cellules/j
NaHCO ₃	1.57 mM _C	18.84 mg _C /L	132 mg _{NaHCO₃} /L	17,4 µg/10 ⁶ cellules/j

1.4 – Suivis de culture

La densité cellulaire, ainsi que la concentration en matière sèche dans les cultures ont été déterminées au cours des différentes cultures incluant des conditions non carencées (préculture et jour 0 de carence), carencées en azote (de 3 à 11 ou 15 jours de carence) et resupplémentées (12, 24 et 72 heures après ajout des nutriments).

La densité cellulaire a été déterminée par comptage dans une cellule de Malassez. La matière sèche a été déterminée par filtration et séchage. Un volume de culture correspondant à environ 100×10^6 cellules est alors passé à travers un filtre de microfibre de verre (Whatman GF/C) préalablement pesé. Les sels résiduels du milieu de culture sont éliminés par deux rinçages de 20 mL de formiate d'ammonium (1M), puis le filtre est placé à l'étuve à 80°C pendant 24h et pesé à nouveau.

1.5 – Caractérisation de la photosynthèse des souches

Des mesures de fluorescence de la chlorophylle ont été utilisées pour caractériser la physiologie photosynthétique des différentes souches de *P. tricornutum* étudiées. Le taux relatif de transport d'électrons (rETR) dans la chaîne de transport d'électrons est estimé à partir de la mesure de l'intensité de la fluorescence de la chlorophylle produite en réponse à une exposition à la lumière. Cette mesure a été réalisée avec un fluorimètre Dual-PAM 100 (Walz, Allemagne). Les mesures obtenues pour différentes intensités lumineuses permettent de tracer des courbes photosynthèse-irradiance (PI) d'où ont été dérivés les paramètres photophysiques de chaque souche : α^β qui correspond à la pente à l'origine de la courbe, considéré comme proportionnel à l'efficacité de capture de la lumière par les microalgues, P^β_{\max} qui correspond à la valeur maximale du rETR, E_k qui est l'intensité lumineuse correspondant à l'intersection des deux premiers paramètres et qui est un indicateur de la saturation de la photosynthèse, au-delà de laquelle un stress photo-oxydatif peut être observé (**Figure 42**).

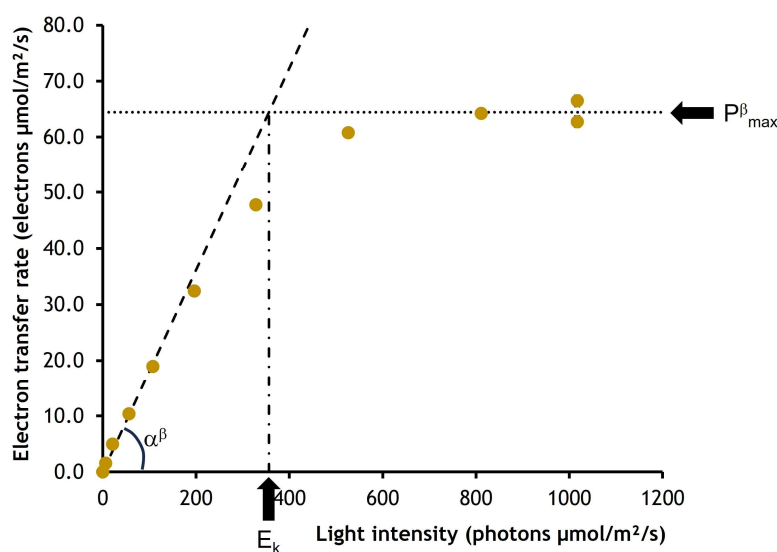


Figure 42 : Exemple de courbe photosynthèse-irradiance obtenue pour l'écotype Pt1.

Les paramètres photophysiques α^β , P^β_{\max} et E_k sont représentés.

2 – Analyses biochimiques

2.1 – Détermination des quotas intracellulaires en carbone et en azote

Les échantillons pour le dosage des contenus intracellulaires en azote et en carbone ont été récoltés par filtration. Avant chaque prélèvement, les parties de l'équipement de filtration en contact du filtre sont lavées avec une solution d'acide chlorhydrique à 10% (v/v) pendant 5 minutes puis rincées avec de l'eau ultra pure. Chaque filtre (Whatman GF/C) a été placé dans une boîte de Pétri en verre et prétraité par passage à l'étuve (250°C, 6h). Ensuite, un volume de culture correspondant à au moins $30 \cdot 10^6$ cellules est récolté. Les filtres contenant les cellules sont séchés (70°C, 24h) puis conservés à -20°C jusqu'à analyse. Avant analyse, les échantillons sont à nouveau séchés à 70°C pendant au moins 12h.

Les analyses ont été conduites au laboratoire Métabolites des micro-algues (METALG, IFREMER Nantes). Les dosages du carbone et de l'azote sont réalisés avec un analyseur élémentaire Flash 2000 NC Soil (Thermo Fisher Scientific). L'échantillon enfermé dans une capsule d'étain est oxydé intégralement dans une atmosphère enrichie en oxygène par une combustion flash à 1800°C ce qui convertit intégralement la matière organique en CO₂, NO_x et H₂O. Les NO₃ sont réduits en NO₂ puis, après élimination de l'eau, la détection du CO₂ et du NO₂ permet de calculer la quantité de carbone et d'azote initialement présentes dans l'échantillon.

2.2 – Extraction et dosage des pigments

Un échantillon de culture de 2 mL (soit $20\text{-}40 \times 10^6$ cellules) est récolté par centrifugation (2 400 x g, 10 min) puis le surnageant est éliminé. Le culot est ensuite lavé par resuspension dans 1 mL de NaCl à 30 g/L (isotonique) puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions et le surnageant éliminé. Un volume de 500 µL d'acétone à 90% est ajouté au culot et le fond du tube est rempli de billes de verre lavées à l'acide (425-600 µm, Sigma-Aldrich). Le contenu du tube est alors soumis à un premier cycle de lyse dans un broyeur à billes (50 Hz, 1 min ; TissueLyser LT, Qiagen). Le tube est alors centrifugé (14 100 x g, 10 min) et le surnageant est collecté dans un nouveau tube conservé dans la glace et à l'obscurité. L'ajout de 500 µL d'acétone et le broyage sont alors répétés jusqu'à ce que le culot soit blanc, en mélangeant les surnageants obtenus à chaque passage.

Un spectre d'absorbance entre 400 et 800 nm est ensuite obtenu à partir de l'extrait (UV 1900i double-beam UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu) (**Figure 43**), ce qui permet de calculer les contenus en chlorophylle *a* et chlorophylle *c* ($c_1 + c_2$) (Jeffrey and Humphrey, 1975) ainsi qu'en caroténoïdes (Carreto and Catoggio, 1977).

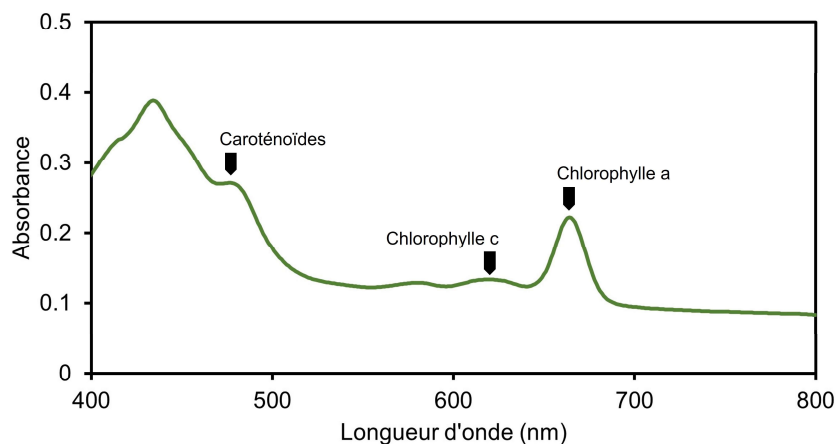


Figure 43 : Exemple de spectre d'absorption d'un extrait de pigments totaux de *P. tricornutum* Pt1. Les flèches indiquent les longueurs d'ondes spécifiques auxquelles les différents pigments absorbent la lumière.

2.3 – Extraction et dosage des protéines et glucides solubles

Un échantillon de culture de 2 mL (soit $20\text{-}40 \times 10^6$ cellules) est récolté par centrifugation ($2\,400 \times g$, 10 min) puis le surnageant est éliminé. Le culot est ensuite lavé par resuspension dans 1 mL de NaCl à 30 g/L (isotonique) puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions et le surnageant éliminé. Le culot est alors conservé à -76°C jusqu'à analyse. Les échantillons sont décongelés puis 100 μL d'eau ultra pure sont ajoutés et le fond du tube est rempli de billes de verre (*acid-washed* 425-600 μm , Sigma-Aldrich). Le contenu du tube est alors soumis à une lyse dans un broyeur à billes (50 Hz, 10 min ; TissueLyser LT, Qiagen). Un volume de 900 μL d'eau ultra pure est alors ajouté, les tubes sont passés au vortex puis centrifugés ($14\,100 \times g$, 20 min). Le surnageant est ensuite utilisé pour dosage.

Pour les protéines, le surnageant est dosé par la méthode de Bradford (1976) avec mesure de l'absorbance à 595 nm. La concentration est déterminée par comparaison avec une gamme étalon de sérum albumine bovine.

Pour les glucides, le surnageant est dosé par la méthode de Dubois (1956) avec mesure de l'absorbance à 490 nm. La concentration est déterminée par comparaison avec une gamme étalon de glucose.

2.4 – Étude des lipides

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons focalisé nos recherches sur les lipides neutres et leur métabolisme. Une analyse plus poussée de cette classe biochimique a donc été mise en œuvre, avec notamment une détermination des compositions en acides gras des lipides totaux et neutres dans les conditions de carence et de resupplémentation. Un organigramme des étapes d'analyse des lipides est présenté en **figure 44**.

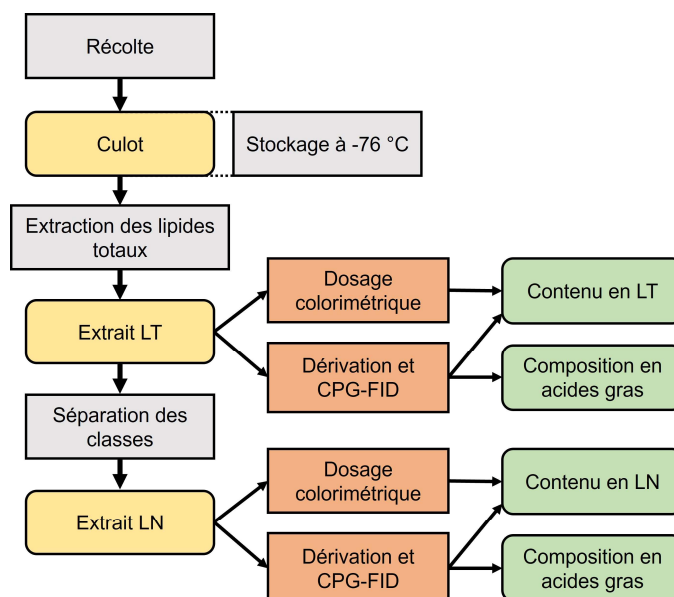


Figure 44 : Étapes d'extraction et d'analyse des lipides de *P. tricornutum*.

2.4.1 – Extraction des lipides totaux

Un volume de 30 à 50 mL de culture (soit $150-500 \times 10^6$ cellules) sont prélevés, ébouillantés (5 min, 99°C) afin d'inactiver les lipases endogènes qui pourraient dégrader les glycérolipides (Bergé et al., 1995), puis centrifugés ($1700 \times g$, 20 min, 4°C). Le surnageant est éliminé puis les culots sont conservés à -76°C jusqu'aux analyses.

Les lipides sont extraits selon la méthode de Bligh and Dyer (1959). Après décongélation des culots, 200 µL de NaCl à 2,8 g/L sont ajoutés et l'ensemble est transféré dans un tube à broyer de Dounce. Un volume de 3 mL de chloroforme/méthanol (1/2 v/v) est ajouté. Le mélange est broyé pendant 1 minute, puis le tube est placé dans une cuve à ultrasons (Branson 3210, Branson Ultrasons) pendant 15 minutes. Un volume de 2 mL de chloroforme est alors ajouté ce qui induit la formation de deux phases et le mélange est passé aux ultrasons pendant 30 minutes. La phase inférieure contenant les lipides est collectée dans un ballon puis 2 mL de chloroforme sont à nouveau ajoutés dans le tube de Dounce, collectés et ajoutés au ballon. L'extrait est évaporé sous vide partiel avec un évaporateur rotatif (Heidolph 94200, Thermo

Scientific). Pour éliminer l'eau résiduelle après une première évaporation, deux fois 2 mL d'éthanol absolu sont ajoutés au ballon puis évaporés. L'extrait lipidique sec est alors repris par 2 mL de chloroforme et conservé dans un tube à méthyler : c'est l'extrait de lipides totaux (LT).

Pour prévenir l'oxydation des extraits lors du stockage, de l'hydroxytoluène butylé (BHT) est ajouté à raison de 0,1 g/L au chloroforme servant à reprendre les extraits lors de la dernière étape.

2.4.2 – Séparation des classes de lipides

L'extrait de LT est ensuite fractionné pour en récupérer les lipides neutres (LN). Le fractionnement se fait sur une colonne de gel de silice (Sep-Pak Silica Plus, Waters) activée par le passage de 20 mL de méthanol puis 20 mL de chloroforme.

Un volume de l'extrait LT correspondant à une masse de 10 mg de lipides (déterminé par dosage spectrophotométrique, voir **2.4.5**) est évaporé sous azote puis repris par 200 µL de chloroforme. Cet échantillon est alors déposé en tête de colonne. Le passage de 30 mL de chloroforme permet d'éluer les LN que l'on récupère dans un ballon. Le chloroforme est alors évaporé sous pression réduite à l'évaporateur rotatif (Heidolph 94200, Thermo Scientific). L'extrait de LN est enfin repris par 1 mL de chloroforme (contenant du BHT) et conservé dans un tube à méthyler. Après récolte des LN, les lipides polaires restants sur la colonne sont également collectés de façon similaire, d'abord les glycolipides (GL) par passage de 40 mL de chloroforme/méthanol 5/1 (V/V) puis les phospholipides et bêtaïne lipides (PL et BL) par 30 mL de méthanol.

2.4.3 – Séparation des lipides par chromatographie sur couche mince

Les différentes classes de lipides présentes au sein des LN ont été séparées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les extraits de LN ont été déposés sur plaque de silice à l'aide d'un déposeur d'échantillon semi-automatique (Linomat V, CAMAG).

Une migration est alors réalisée pendant 1 heure avec une phase mobile peu polaire hexane/diéthyl ether/acide acétique (40/10/1 ; V/V/V), permettant la séparation des différentes classes de lipides neutres. Des standards lipidiques sont déposés pour identifier chaque classe : une monolinoléine (pour les monoglycérides), deux dilinoléines (pour les diglycérides, avec les chaînes en positions *sn*-1 et *sn*-2 ou *sn*-1 et *sn*-3), l'acide linoléique (pour les éventuels acides gras libres) et l'huile de colza (pour les triglycérides).

La révélation des plaques de CCM a été réalisée par différentes méthodes. Certaines plaques ont été révélées de manière non destructive par pulvérisation de primuline (5 mg/100 mL dans l'acétone à 80%) suivie d'une visualisation en chambre noire sous une lampe à UV (366 nm).

D'autres plaques ont été révélées de manière destructive par pulvérisation d'acétate de cuivre dans l'acide phosphorique à 15% puis passage à l'étuve à 180°C pendant 5 minutes.

2.4.4 – Détermination des profils en acides gras et quantification

Les profils en acides gras des LT et des LN ont été déterminés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID). Les acides gras étant trop peu volatils pour être analysés directement, ils doivent être dérivés sous forme d'esters méthyliques d'acides gras plus volatils.

Le solvant des extraits lipidiques à dériver est d'abord évaporé sous flux d'azote. Un volume d'1 mL d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol.L⁻¹ dans le méthanol y est ajouté, puis les tubes sont incubés à 80°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, 2 mL d'une solution de trifluorure de bore à 15% dans le méthanol sont ajoutés et les tubes sont incubés à nouveau à 80°C pendant 20 minutes. Le mélange réactionnel contient alors les esters méthyliques d'acides gras. Pour les extraire, 1 mL d'isooctane est ajouté, ainsi qu'1 mL d'une solution de NaCl à 35% (w/V) (*salting out*). Les tubes sont agités puis centrifugés (190 x g, 2 min) pour séparer les phases. La phase supérieure d'isooctane est alors prélevée et séchée sur une colonne de sulfate de sodium anhydre avant d'être conservée dans un tube à hémolyse. L'extraction est alors renouvelée avec 1 mL d'isooctane.

L'analyse est réalisée avec un chromatographe TRACE 1300 (Thermo Scientific) équipé d'une colonne CP-Sil 88 de 25 m de longueur et 0,25 mm de diamètre. Le gaz vecteur est de l'azote circulant au débit constant de 1 mL/min. Cinq microlitres d'échantillon sont injectés à 230°C. Pendant l'analyse, le four est d'abord maintenu à 120°C pendant 4 minutes, puis la température augmente jusqu'à 220°C au rythme de 6°C/min avant d'être maintenue à 220°C pendant 5 minutes. En sortie de colonne, le détecteur alimenté par un mélange d'hydrogène et d'air est à une température de 230°C. Les acides gras sont identifiés par comparaison avec le temps de rétention de standards préalablement analysés.

Pour quantifier les lipides présents dans les extraits, une quantité précise d'acide pentadécanoïque C15:0 (absent du profil lipidique de *P. tricornutum* et ayant un temps de rétention qui n'interfère pas avec d'autres acides gras) est ajouté comme standard interne avant la dérivation. La quantité de chaque acide gras dans les extraits est alors déterminée par comparaison de l'aire des pics dans le chromatogramme.

2.4.5 – Dosage spectrophotométrique des lipides

Une seconde méthode de quantification des lipides présents dans les extraits a été mise en œuvre (Marsh and Weinstein, 1966). Elle est fondée sur le brunissement des acides gras portés à haute température en milieu acide. Un volume précis d'extrait est prélevé puis évaporé sous azote sec. Deux mL d'acide sulfurique concentré (96%) sont ajoutés, les tubes sont agités au vortex puis incubés à 200°C pendant 20 minutes. La réaction est stoppée par immersion des tubes dans la glace. Après refroidissement, 2 mL d'eau ultra pure sont ajoutés, le contenu des tubes est homogénéisé au vortex puis placés à nouveau dans la glace pendant quelques minutes. L'absorbance est alors mesurée à 375 nm et la concentration est déterminée par comparaison avec une gamme étalon d'huile de colza (**Figure 45**).

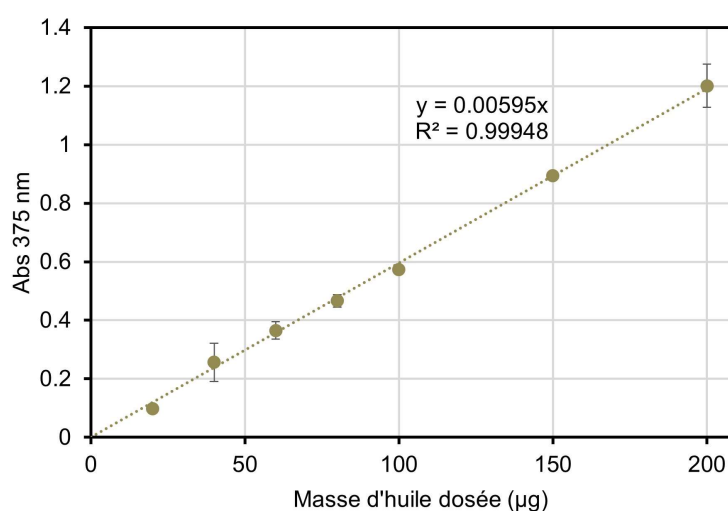


Figure 45 : Courbe d'étalonnage du dosage des lipides selon la méthode de Marsh et Weinstein. L'axe des abscisses est exprimé en masse et non en concentration car les extraits chloroformiques contenant les échantillons sont évaporés avant dosage.

3 – Méthodes de Microscopie

Les analyses de microscopie ont été réalisées lors d'un séjour de recherche au sein de l'université de Rouen Normandie, au laboratoire GlycoMEV (UR4358) pour la réalisation des cultures de microalgues et sur la plateforme PRIMACEN (INSERM, CNRS, HeRacLeS US51 UAR2026) pour l'utilisation des microscopes.

3.1 – Microscopie confocale

La microscopie confocale a été utilisée pour observer et quantifier les volumes des gouttelettes lipidiques (LD) et des thylakoïdes dans les cellules au cours de la carence en azote et de la resupplémentation.

3.1.1 – Marquage avec le BODIPY 505/515

Pour visualiser les LD, le marqueur fluorescent BODIPY 505/515 (Invitrogen D3921) a été utilisé. Un volume de 1 mL de culture a été ajouté dans un tube contenant 1 μ L de BODIPY 505/515 dans le DMSO à une concentration de 1 mg/mL, donnant une concentration finale de 1 μ g/mL et permettant d'éviter que la concentration en DMSO dépasse 1‰.

Après marquage, 10 μ L de culture ont été laissés à sédimenter pendant 5 minutes sur une lame de verre puis couvertes par une lamelle.

3.1.2 – Acquisition par microscopie confocale

Les observations ont été réalisées avec un microscope confocal droit Leica TCS SP8 équipé d'un objectif à immersion dans l'huile (Leica Microsystems). Les fluorescences de la chlorophylle et du BODIPY 505/515 ont été mesurées suite à une excitation à 488 nm. La lumière émise a été collectée via trois détecteurs : un détecteur photomultiplicateur pour la lumière transmise et deux détecteurs hybrides en mode « comptage » pour les deux émissions de fluorescence, avec la lumière émise par la chlorophylle collectée sur la plage de longueurs d'onde 650-700 nm et celle émise par le BODIPY 505/515 sur la plage 505-550 nm. Les images ont été acquises en 3D (xyz) avec un facteur de zoom de x2,5 et un pas de 0,1 μ m entre les images sur l'axe z.

Les images brutes ont été traitées par déconvolution en utilisant le logiciel Huygens professionnel 4.5.1 (Scientific Volume Imaging), afin de corriger les déformations des objets (LD et plaste) induites par le système optique. Pour chaque image, l'importance respective du signal et du bruit est déterminée manuellement dans l'interface du logiciel. Ces paramètres, ajoutés aux caractéristiques du microscope et du montage de la lame, permettent de mettre en œuvre la déconvolution. Les images déconvoluées ont ensuite été traitées via le logiciel libre Fiji (ImageJ).

3.1.3 – Modélisation 3D avec IMARIS

Les images déconvoluées ont également été utilisées comme entrée pour la modélisation 3D des gouttelettes lipidiques et des thylakoïdes avec le logiciel IMARIS 9.0 (Oxford Instruments). Dans chaque image, chacune des cellules présentes a été détournée manuellement pour en modéliser les LD et le plaste (visualisé via la fluorescence émise au niveau des thylakoïdes). Des volumes en 3D ont été créés en définissant deux paramètres de modélisation « smooth » (s) et « background » (b), qui permettent d'ajuster les volumes 3D créés à la forme du signal fluorescent. Des expériences préliminaires ont permis de déterminer des valeurs assurant un bon accord signal-modélisation : pour les thylakoïdes (s : 0,3 μ m, b : 0,2 μ m) et les LD de Pt1 (s : 0,1 μ m, b : 0,2 μ m) et de Pt4 (s : 0,1 μ m, b : 0,4 μ m). Les valeurs pour Pt1 et Pt4 sont

différentes car la valeur dépend de la taille des objets à modéliser, Pt4 ayant en moyenne des LD plus grandes, sa valeur de background est plus élevée.

Les images obtenues en transmission ont permis d'identifier les limites de chaque cellule pour retirer d'éventuels signaux fluorescents détectés à l'extérieur des cellules et ainsi éliminer les faux positifs.

Enfin, le volume et les coordonnées du barycentre de chaque objet ont été récupérées permettant de calculer un certain nombre de paramètres : quota de LD par cellule, volume total de LD par cellule, répartition du volume total entre les LD d'une même cellule, volume du plaste et distance euclidienne entre LD et plaste.

L'ensemble de la démarche est résumé dans la **figure 46**.

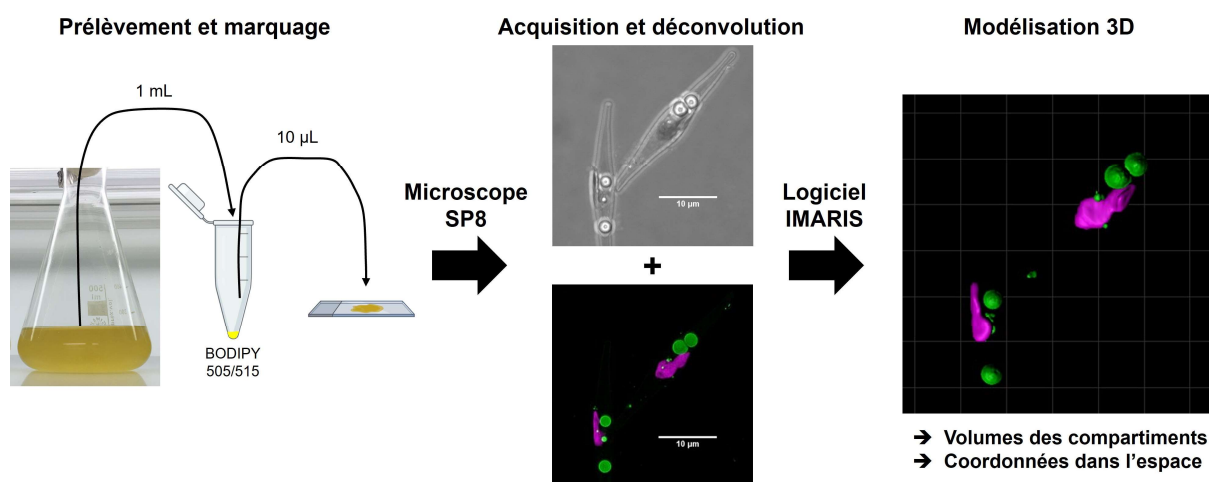


Figure 46 : Démarche mise en œuvre pour les mesures de microscopie confocale.

L'autofluorescence de la chlorophylle est représentée en magenta et la fluorescence du BODIPY 505/515 en vert.

3.2 – Microscopie en transmission (Cell Discoverer 7)

La microscopie en transmission a été utilisée pour mesurer les dimensions des cellules au cours de la carence en azote et de la resupplémentation.

3.2.1 – Acquisition

Les observations de plusieurs centaines de cellules à la fois ont été réalisées avec un microscope inversé Zeiss Cell Discoverer 7 (Carl Zeiss France). Les échantillons ont été déposés dans une plaque 24 puits à fond en verre et couverts par une lamelle afin que les cellules soient au maximum dans le même plan optique. Les images ont été obtenues à travers un objectif à immersion dans l'eau x 50 avec un paramètre d'agrandissement du tube optique

de 0,5. Dans chaque puits, deux mosaïques constituées de 5x5 images ont été collectées représentant plusieurs milliers de cellules.

3.2.2 – Traitement des images

L'analyse d'images a ensuite été automatisée via une macro développée pour ce projet sur le logiciel libre Fiji (ImageJ). Le plugin "Trainable Weka Segmentation" (Arganda-Carreras et al., 2017) a été utilisé pour séparer les cellules du fond de l'image via une approche de *machine learning*. Pour la phase d'entraînement de l'algorithme, une image a été sélectionnée au hasard dans le jeu de données, puis 20% des cellules ont été manuellement catégorisées comme « cellule » tandis qu'un nombre identique d'éléments autres présents dans les images (granularité du fond, bulles d'air, débris...) a été assigné à une seconde catégorie. Pour différencier les deux types d'éléments (« cellules » et « autres »), l'algorithme a été entraîné avec 3 filtres permettant la détection des angles et/ou des textures (filtres Sobel, Maximum et Gabor). À l'issue de cette phase d'entraînement, l'algorithme a été utilisé pour créer une carte de probabilité de chaque image, fournissant la probabilité que chaque pixel appartienne à une cellule ou à un autre élément.

Finalement cette carte de probabilité a été utilisée comme donnée d'entrée pour l'outil « Analyse particule » de Fiji qui a permis de récupérer pour chaque cellule la longueur et la largeur, respectivement via le diamètre de Feret et le petit axe de l'ellipse associée à la cellule. Les caractéristiques fournies par l'outil « Analyse particules » ont également permis d'éliminer certains faux positifs comme des bulles, via l'analyse du rapport longueur sur largeur (Aspect Ratio), la mesure de la circularité des objets (les objets trop circulaires étant éliminés car les cellules que l'on mesure sont fusiformes), ou la convexité des objets (un objet concave a peu de chance d'être une unique cellule fusiforme qui a globalement une forme elliptique).

À partir de la longueur et de la largeur ainsi mesurés, le volume cellulaire a été estimé via un modèle de « sphéroïde allongé » (Hillebrand et al., 1999) selon l'équation suivante :

$$Volume\ estimé = \frac{\pi}{6} \times Largeur^2 \times Longueur$$

où la largeur et la longueur sont en μm et le volume estimé en μm^3 .

4 – Analyses bioinformatiques

4.1 – Récupération et vérification des séquences

L'objectif de l'étude bioinformatique était d'identifier dans le génome de *P. tricornutum* de nouvelles lipases potentielles. Les termes « lipase », « phospholipase » et « alpha/beta hydrolase » (les lipases sont en général des α/β hydrolases) ont été recherchés dans l'annotation du génome Phatr3 (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum/Info/Index). L'analyse a également inclus 3 protéines présentées comme lipases dans de précédents travaux (une patatin-like phospholipase domain containing protein 3 (Wang et al. 2015), et deux phospholipases A (Conte et al. 2018)).

Les séquences d'acides aminés ont été obtenues dans la base de données Ensembl Protist. Ensuite, ces séquences ont été fournies à la base de données Pfam (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) afin de vérifier leur annotation avec un seuil E-value de 10^{-5} . Les protéines ne donnant pas d'annotation significative ont été retirées du jeu de données. Une seconde étape de vérification a consisté en un contrôle de la présence du pentapeptide GX SXG caractéristique des lipases (ou GD SL pour la famille particulière des GD SL lipases). Une troisième étape a été menée sur les α/β hydrolases par une vérification dans la base de données ESTHER (<https://bioweb.supagro.inrae.fr/ESTHER/general?what=index>) spécifique de cette famille. Les protéines dont la meilleure annotation dans cette base n'était pas une lipase ont également été exclues.

Les séquences ainsi obtenues ont été alignées via l'algorithme MAFFT disponible sur la plateforme NG phylogeny (<https://ngphylogeny.fr/>) avec les paramètres par défaut pour vérifier la présence de domaines, motifs et acides aminés conservés.

4.2 – Prédiction de caractéristiques des protéines candidates

Le poids moléculaire, les profils en acides aminés, le coefficient d'extinction molaire à 280 nm dans l'eau, le point isoélectrique, la demi-vie de la protéine, les index aliphatique, d'instabilité et GRAVY (hydrophobicité) ont tous été prédits en utilisant l'outil en ligne ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

La localisation subcellulaire des protéines candidates a été prédite en utilisant une version adaptée du *pipeline* proposé par Van Tol and Armbrust (2021). Divers programmes permettant de prédire la localisation des protéines ont été utilisés : TargetP 2.0 (Almagro Armenteros et al., 2019), SignalP 6.0 (Teufel et al., 2022), SignalP 3.0 (Dyrløv Bendtsen et al., 2004), HECTAR (Gschloessl et al., 2008), ASAFind (Gruber et al., 2015) et MitoprotII (Claros and Vincens, 1996). Les séquences ont également été examinées (présence de signaux

d'adressage vers le péroxysome et de signaux de rétention dans le RE) avec l'outil ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>), tandis que la présence de domaines transmembranaires a été prédite par DeepTMHMM (Hallgren et al., 2022) (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>). Les résultats de ces programmes ont été utilisés séquentiellement pour obtenir une prédiction de localisation finale (voir **section III-2.3**). Ce pipeline permet de prédire la présence des protéines dans 7 compartiments : cytosol, RE/cytosol, RE, plaste, mitochondrie, mitochondrie/péroxysome, et péroxysome. Pour les protéines prédites dans le RE, la présence du possible signal d'adressage vers la vacuole ([D/E]-XXXL-[L/I] or DXXLL) a également été recherchée avec ScanProsite.

Enfin la présence de sites d'acylation et de prénylation post-transcriptionnelles a été prédite avec GPS-Lipid (Xie et al., 2016) (<http://lipid.biocuckoo.org/>) en utilisant l'option la plus restrictive.

4.3 – Prédiction de la structure tertiaire des protéines candidates

Certaines protéines dont les transcrits étaient fortement régulés en réponse à une carence d'azote ont été sélectionnées pour prédire leur structure tertiaire. La séquence primaire de ces protéines a été fournie à l'algorithme Alphafold2 via l'interface Colabfold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). Ensuite les structures obtenues ont été visualisées et analysées en utilisant le logiciel libre VMD 1.9.3. Différentes analyses de qualité des structures ont été menées : des diagrammes de Ramachandran ont été tracés sur la plateforme Z-lab (<https://zlab.umassmed.edu/bu/rama/>) et des scores d'énergie ont été obtenus via l'outil Protein Structure Analysis-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) et extraits avec l'outil WebPlotDigitizer (<https://automeris.io/WebPlotDigitizer/>).

5 – Méthodes de biologie moléculaire

5.1 – Extraction des ARN totaux

Pour l'extraction des ARN totaux, un volume de culture correspondant à $200 \cdot 10^6$ cellules a été récolté par filtration (filtres GF/C préalablement chauffés à 150°C pendant 6h pour éliminer les RNases) puis congelé immédiatement dans l'azote liquide.

L'extraction a ensuite été conduite en utilisant le kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma Aldrich). Le filtre contenant les cellules est broyé dans un mortier avec 1 mL de tampon de lyse contenant du β -mercaptoéthanol (10 μL pour 1 mL de tampon). L'ensemble est récolté dans un tube Eppendorf, passé au vortex et incubé pendant 5 minutes à 56°C puis centrifugé

(14 100 x g, 3 min). Le surnageant est collecté et transféré sur une colonne de filtration et le tout est centrifugé (14 100 x g, 1 min) pour éliminer les débris restants. Un volume de 750 µL de "Binding Solution" est ajouté au lysat récupéré sous la colonne de filtration et mélangé par aspiration refoulement. Le mélange est transféré sur une colonne d'accrochage (Binding) où les ARN restent accrochés après une centrifugation (14 100 x g, 1 min). La colonne est lavée une première fois avec 300 µL de la solution de lavage I (Wash Solution I) par centrifugation (14 100 x g, 1 min).

Pour éliminer l'ADN génomique éventuellement présent, un volume de 80 µL d'une solution de DNase I (On-Column DNase I digestion set, Sigma-Aldrich) préparée extemporanément est ajouté à la colonne et incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Un second lavage est alors conduit avec 500 µL de la solution de lavage I (14 100 x g, 1 min), suivi de deux lavages avec 500 µL de la solution de lavage II (Wash solution II) éliminés par centrifugation (14 100 x g, 30 sec). Une dernière centrifugation (14 100 x g, 1 min) est réalisée pour sécher la colonne. Un volume de 50 µL de solution d'éluion est finalement ajouté, incubé pendant 1 minute à température ambiante et centrifugé (14 100 x g, 1 min). L'extrait obtenu contient les ARN totaux et peut être conservé à -76°C.

Cet extrait est dosé par mesure de son absorbance à 260 nm à l'aide d'un Nanodrop One[®] (Thermo Fisher Scientific) qui fournit également une indication de pureté de l'extrait par le rapport d'absorbances 260/280 nm (l'absorbance à 280 nm estime la contamination protéique). L'extrait d'ARN est considéré comme pur si la valeur se situe dans l'intervalle 2,0-2,2 et si le rapport 260/230 nm (l'absorbance à 230 nm estime la contamination par les solvants d'extraction) est supérieur à 1,8.

5.2 – La transcription inverse

L'extrait d'ARN totaux contient l'ensemble des ARN messagers contenus dans les cellules qui vont être convertis en ADN complémentaires (ADNc) via une réaction de transcription inverse (*Reverse Transcription*, RT). Un volume d'extrait correspondant à 1000 ng d'ARN totaux a été prélevé et mélangé avec 1 µL d'amorces Oligo(dT)₁₅ à 500 ng/µL (soit 500 ng) et 1 µL d'amorces hexamères aléatoires à 500 ng/µL (soit 500 ng), puis le volume est ajusté à 15 µL avec de l'eau sans nucléases. Le mélange est incubé dans un thermocycleur programmable GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) à 70°C pendant 5 minutes pour dénaturer les ARN messagers et induire leur association avec les amorces, puis conservé dans la glace. Ensuite sont ajoutés 10 µL d'un mix RT (Promega) contenant : 5 µL de tampon M-MLV 5X, 1,25 µL de dNTP à une concentration de 10 mM, 1 µL de transcriptase inverse M-MLV à 200 U/µL, 0,6 µL d'inhibiteur de RNase à 40U/µL et 2,15 µL d'eau sans nucléases. Le mélange

final de 25 µL est incubé dans un thermocycleur à 42°C pendant 1h, puis l'enzyme est inactivée par une incubation à 70°C pendant 5 minutes. Les échantillons d'ADNc sont ensuite conservés à -20°C.

5.3 – PCR quantitative

Les analyses de PCR quantitatives ont été menées sur les échantillons d'ADNc afin de quantifier l'expression de gènes du métabolisme des lipides neutres et des glucides au cours de la carence azotée et de la resupplémentation. Le principe est d'ajouter à la réaction de PCR du BRYT green (kit GoTaq® qPCR Master Mix, Promega), un agent intercalant de l'ADN, dont la fluorescence est mesurée à chaque cycle d'amplification. La fluorescence mesurée fournit une valeur de Ct (*cycle threshold*) indiquant le cycle à partir duquel la fluorescence est considérée comme significative. Ainsi, plus le Ct est faible (fluorescence détectée rapidement dans la réaction), plus le transcrit correspondant au gène est abondant, donc plus le gène est exprimé. La comparaison des Ct entre les différents points de prélèvement permet de déterminer si un gène est sur-exprimé ou sous-exprimé.

5.3.1 – Conception des amorces

Les séquences des transcrits des gènes à tester ainsi que des gènes de ménage ont été récupérées dans la base de données Ensembl Protist. Pour chaque gène, un couple d'amorces a été conçu en utilisant le logiciel Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) avec comme contraintes une température d'hybridation (T_m) de $60 \pm 1^\circ\text{C}$, une longueur de produit d'amplification entre 80 et 160 paires de bases, une longueur des amorces de 20 ± 3 paires de base, des scores de complémentarité proches de 0 et une localisation de la paire d'amorces la plus proches de l'extrémité 3' de la séquence du gène. Les couples d'amorces obtenus sont présentés dans le **tableau VI**.

Tableau VI : Couples d'amorces utilisés pour la qPCR.

Gène	Abrv.	ID	FW (5'→3')	RV (5'→3')
Phatr3				
Métabolisme des triglycérides et protéines majeures de LD				
Glycerol-3-phosphate acyltransférase	GPAT1	J54709	ATGCCTTGGTCGGTGAACATC	CGAGAAGCAGGAGGTGAACTAT
	GPAT2	J3262	CAAGTTCAAAGAAGGTGGTGCG	TAGAGTCAAAGGGTGCAAGTGG
	GPAT3	EG02461	GACAAGGTCGGAACAAACAGTC	CTTGAACTCTCGTCGATTGCA
Lysophosphatidic acid acyltransferase	LPAAT1	J43099	AGCATCCAAAGCCAGTAGTACC	GCTGTGTAGTGCGATAAGGTCT
	LPAAT2	J11916	CCCTCGGCAAAGCTATTTACC	CGGGAAAGGTGCATAGATGGA
	LPAAT3	J20460	GAATGATCCCTCCAATCCCCAA	ACGAACAGCCAGCAATCCAAC
	LPAAT4	J48640	TTCGGGTAAGCAGACACAGC	GGCTTGAACACACCCTTTTAAAG
	LPAAT5	J45551	GCCCCTGTTTCATTGCTGTTT	GACTTGCCTTGAACACAGG
Diacylglycérol acyltransférase	DGAT1	J9794	TTGGGCACAATCCGTAGCAAC	TCCATTGATCCCAAACGCAATC
	DGAT2A	J49462	GGAGCAACTGTCCCTGTTTCTA	CTTACGGGTGGCAAATTTGGT

	DGAT2B	J49544	AGATCCACGAAACCTCACCG	GCTCCATGCGGTTGAAAGAC
	DGAT2C	J31662	GGCTATTGGAGTATGTTTCGCG	CTTGCCCACGACACACAATAC
	DGAT2D	J43469	TTTGGTCTGCGAATGTGGCTC	AAGGGTGGTATCGACTGGTCTA
	DGAT2E	EG00369	GATTCGTTCCGGTTGGCTTTAGA	GCCTCGTTCTCACCAAATCC
	DGAT3	J49708	GATGGATCAGAGATTACCCGCT	CGTGCGTGCAATTTGTTTTGTC
Phospholipide:diacylglycérol	PDAT1	J8860	CTTGTGGAAGCGAAGAGAGACT	GCCACCACGCATAGGATCAT
acyltransférase	PDAT2	J49702	TGCCATAAATCCGTTGCGTGC	AGTGGATTGACGGTGTGTGTAC
Class 3 lipases	Cl3lip1	EG02610	CGCTCATGTCCGTTCTCTCTTT	TGCTCCTGAAAAGAACCCTGC
	Cl3lip2	J44028	AGTTGGGTTTGGCTGTCTTC	AACTGGATTTGCACGAGGGAC
	Cl3lip3	J41624	TCCTTGGTCTCAGCGAACTAT	CAAGAAGGCATCGGTCCAGTT
	Cl3lip4	J45660	GCAAACGCTCCAACCTTTGAATG	TTCATGACAGGCCAGCAATG
α/β hydrolases lipases	ABlip1	J54974	TATCAAGTGAAGTACGGGCC	TGACAGGTCGCCGTGATAAATC
	ABlip2	EG02408	CGCAGTTCGCCAATCAAATG	GTGCGTCAGACCAACCTTCG
	ABlip3	J11048	CGCCATGTTCAACGCCTTCA	ATGCAAATTCATCGCCTCGG
GDSL lipase	GDSLip1	EG02330	GTTTTGGTGTGTTGTGCGGGG	GGTCGCCTATCCACTACTGTGT
Patatin-like lipase	PLPlip1	EG00720	TGAAATTCCTGAGCCGTCTC	TAGTAGAGGGAAGGTAGCCGAA
Stramenopile LD protein	StLDP	J48859	TTAGCCGTCACCTTTGCCATG	AATGTGTGGACGACTGGCATAAC
<i>P. tricornutum</i> LD protein	PtLDP1	J44488	CTCAGCAGCGACCCGATTAAT	GCGTCACTTGGGGATGTACTAA
Métabolisme de la chrysolaminarine				
UDP-glucose	UGP1	EG02613	TGCGGTTCCCTAATGACGGATG	AAAGCCTCTGAAGCCACCATG
pyrophosphorylase	UGP2	J23639	AATTCTGTGCTTCCGGCCTTG	ATCCGTTTTGTGTTCCAGCCG
β -1,3- glucan synthase	BS1	J9617	ACTCGACGAAGACACAACGAATG	AGGGGAAAACGGTGCATCAAC
β -1,6-Transglycosylase	TGS1	J50238	TGCGACAATTTTCTGCCTCC	TCGTTTTGCATGTCTTCGATAAA
Endo- β -glucosidase	EndoG1	EG02526	CGAAACATGGACAGTACCCTCT	TCCCCATCCTGATCGAGACTAT
	EndoG2	J54973	AAGGCCCTTCAGCTTTACC	TGCTACCCTTTCCGCTCTTG
	EndoG3	J52685	ACGCTCAACTCCATAGGGCT	CGGCGAATTCTGAGGCTGT
Exo- β -glucosidase	ExoG1	J1372	CCACTTTGAACACTGGCCG	CTAGCACGACCTTCAGCGAA
	ExoG2	J45418	TCACAATCGCCAGCCTAGTTTG	GCTTTCATACCAACCGCAAC
	ExoG3	J49610	TGACGAATTTCCACCACCGAC	CGTTGTATTGCTTGCACCAC
	ExoG4	J54569	TGGGACTTCTCTCGTGGTCT	CAAAATGCGGTACAGTTCCCAT
	ExoG5	J43302	CCTGGAAGTTGTATGGCGGT	GGAGATTGAGACAGGGCAG
Gènes de ménage				
Actine 16	Act16	J29812	GATGAAGAAAGCCGCTGAGTCT	TGCCGTCCATTTCCAAACCAG
Actine 12	Act12	J29136	GCCTCGTTTCTTTCCGCATTTG	TTGCCTTGAGCATGACACTC
Tubuline α	TubA	J54534	CACACGGACTGCACCTTCTGT	ACCTGAGCAATGAGACGGTTC
Tubuline β	TubB	J21122	AGCTTCCGAGTTTTGACCGTC	TACCACGGAACATCATGGCAC
TATA-box binding protein	TBP	J10199	TTTGCCAGTTACGAGCCAGAG	CCTTCTTGGCACCAGTAATGAC
Elongation Factor 1 α	EF1a	J18475	AGGCCAGGTCATTGTCATG	CCAAAACCTTTCCACTGCGG
Histone 4	Hist4	J34971	CAAGGGTCTCGGAAAGGGAG	GTTTCACACCACCACGACG
Ubiquitine	Ubi	J22043	CCATCGACAACGTCAAGACCA	CCACGTAGACGCAACACCAAA
Ribosomal protein small subunit 30S	RPS	J10847	CAGTTGCCCGACGAAGATCT	TGCTCAACCACTGCCTTCC
Cyclin-dependant kinase A	CdkA	J20262	ATTGTCTGCTCTCGTGCCAAG	CAACATTACGCCGCTGAAAGT

5.3.2 – Test d'efficacité des amorces

Les amorces ont toutes été testées sur les échantillons d'ADNc de Pt1 et de Pt4. À partir d'une concentration initiale de 40 ng/μL, des dilutions successives d'ADNc aux 1/10, 1/100, 1/200, 1/400 et 1/800 ont été réalisées en duplicats avec de l'eau sans nucléases comme contrôle négatif.

Dans une plaque 96 puits, le mélange réactionnel pour la qPCR a été distribué avec dans chaque puits 10 μL de GoTaq® qPCR Master mix 2X, 1 μL d'amorce Forward à 10μM et 1 μL d'amorce Reverse à 10 μM du gène testé dans ce puits, et 3 μL d'eau sans nucléase pour compléter à 15 μL. Dans chaque puits, 5 μL de la dilution d'ADNc à tester est ensuite ajouté aboutissant à un volume final de 20 μL. Les puits sont fermés par une feuille plastique adhésive puis centrifugée pendant 30 secondes. La réaction de qPCR est ensuite conduite dans un thermocycleur QuantStudio 3 (Applied Biosystems) selon le programme suivant : (1) 2 minutes à 95 °C (activation de la polymérase), (2) 40 cycles d'amplification consistant en 15 secondes à 95 °C (dénaturation) suivis d'1 minute à 60 °C (hybridation des amorces et élongation), (3) augmentation progressive de la température de 60 à 95 °C en 15 secondes afin d'établir la courbe de fusion, nécessaire pour vérifier la présence d'un seul produit d'amplification et l'absence de dimères d'amorces.

Les valeurs de Ct ont ensuite été tracées en fonction du log10 de la concentration d'ADNc et l'efficacité (E) a été calculée à partir de la pente de la droite obtenue selon l'équation :

$$E = 10^{-\frac{1}{a}} - 1$$

où E est l'efficacité et a la pente de la droite. Un exemple de telles droites est présenté dans la **figure 47**.

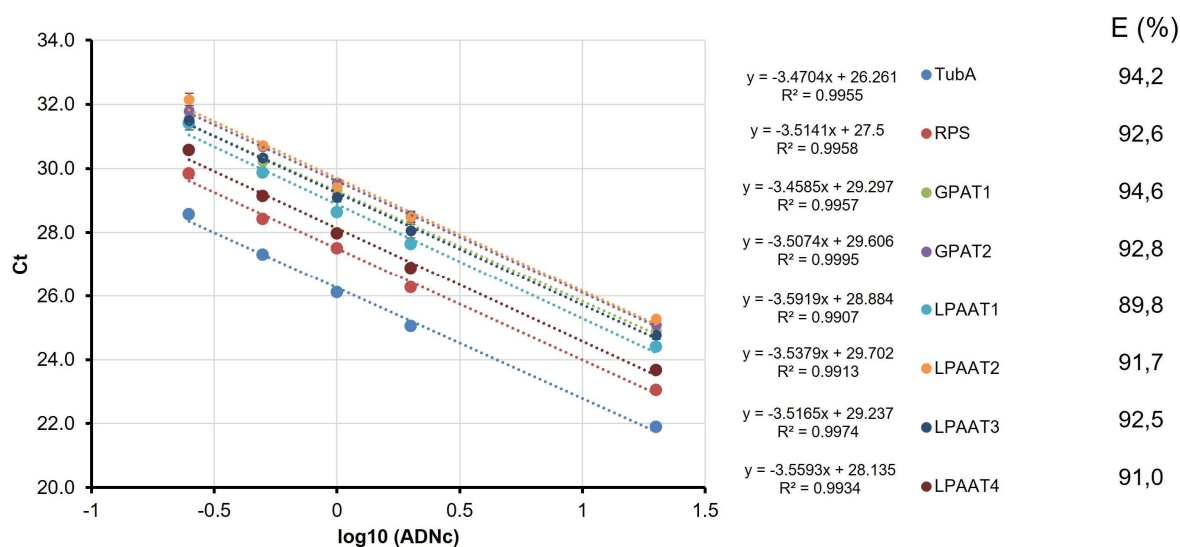


Figure 47 : Exemples de courbes établies pour déterminer l'efficacité des amorces.

Une valeur d'efficacité de 1 (100%) indique que chaque cycle de qPCR produit un doublement de la quantité d'ADN dans le puits. Une efficacité comprise entre 80 et 120% peut être considérée comme adéquate.

Ces expériences ont également permis de sélectionner la dilution au 1/10 pour la quantification, correspondant à une concentration de 4 ng/μL.

5.3.3 – Sélection des gènes de ménage

Les 10 gènes de ménage testés (Actin 12, Actin 16, Tubulin α , Tubulin β , TATA box binding-protein, Elongation Factor 1 α , Histone 4, Ubiquitine, Ribosomal Protein Small Subunit 30S, Cyclin-dépendant kinase A) ont ensuite été amplifiés sur des échantillons d'ADNc issus de l'ensemble des conditions et jours de culture testés en triplicats biologiques (J0, J11 en carence azotée, h24 et h72 en resupplémentation) pour tester leur stabilité au cours de l'expérience. Les échantillons d'ADNc ont été dilués à une concentration de 4 ng/μL (dilution 1/10) puis déposés dans les puits et la qPCR a été menée dans les conditions décrites en 5.3.2.

La stabilité des gènes de ménage a ensuite été évaluée par l'outil en ligne RefFinder (<https://blooge.cn/RefFinder/>) (Xie et al., 2023) qui intègre quatre indices de stabilité (GeNorm, NormFinder, BestKeeper et Comparative Delta Ct) pour créer son propre indice (*Comprehensive index*). Chacun des quatre indices est d'abord calculé, fournissant quatre classements des gènes de ménage testés. Les rangs de chacun des gènes dans ces classements sont récupérés, puis une moyenne géométrique est calculée par gène. Cette moyenne correspond au *Comprehensive index*, dont les scores les plus bas correspondent aux gènes les plus stables.

L'indice a permis de sélectionner les gènes RPS (Ribosomal Protein Small Subunit 30S) et TubA (Tubulin α) comme les plus stables dans notre expérience (**Figure 48**).

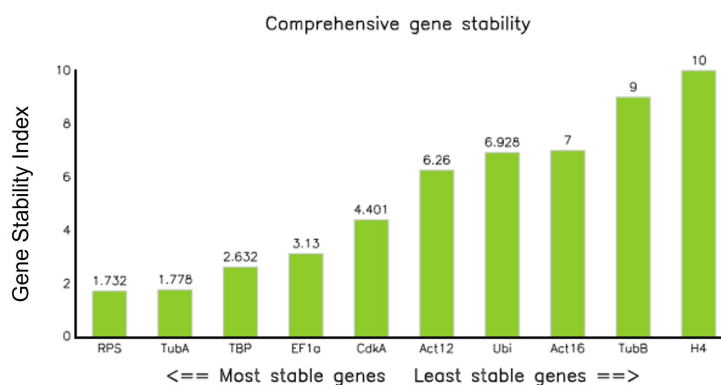


Figure 48 : Résultats du calcul de l'indice RefFinder quantifiant la stabilité des gènes de ménage.

5.3.4 – Calcul de l'expression relative des gènes testés

L'expression des gènes sélectionnés dans le métabolisme des TG et de la chrysolaminarine a ensuite été mesurée en utilisant les mêmes conditions que les gènes de ménage (5.3.2). L'expression de ces gènes a été mesurée en triplicats biologiques et en duplicats techniques et normalisée par l'expression des deux gènes de ménage. L'expression relative (ER) au point de temps t a été calculée avec la méthode $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001) selon la formule suivante :

$$ER_t = \frac{(1 + E_{gene})^{(Ct_{gene_{ref}} - Ct_{gene_t})}}{\sqrt{(1 + E_{RPS})^{(Ct_{RPS_{ref}} - Ct_{RPS_t})} \times (1 + E_{TubA})^{(Ct_{TubA_{ref}} - Ct_{TubA_t})}}$$

où ER_t est l'expression relative du transcrit au point de temps t, E_{gene} l'efficacité du gène, E_{RPS} et E_{TubA} les efficacités des gènes de ménage, $Ct_{gene_{ref}}$ et Ct_{gene_t} les Ct obtenus pour le gène test au temps de référence et au temps t, et $Ct_{RPS_{ref}}$, Ct_{RPS_t} , $Ct_{RPS_{ref}}$ et Ct_{RPS_t} les valeurs de Ct respectives pour les gènes de ménage. L'ER a ainsi été calculée par rapport au temps de référence J0 (non carencé) pour le point de temps J11 (carencé en azote), ainsi que par rapport au temps de référence J11 (carencé en azote) pour les deux points de temps h24 et h72 correspondant à la resupplémentation afin de visualiser l'effet de cette dernière.

6 – Traitement de culture par des inhibiteurs de la dégradation des lipides

6.1 – Inhibiteurs de la dégradation des lipides

Deux molécules inhibitrices de la dégradation des lipides ont été testées avec pour objectif de quantifier l'importance relative de la lipolyse et de la lipophagie chez les diatomées :

- L'ATGListatine est un inhibiteur de l'Adipose Triglyceride Lipase (Sun et al., 2019), lipase *patatin-like* initiatrice de la lipolyse chez les animaux. Les solutions d'ATGListatine pour le traitement sont préparées dans du DMSO stérile (solution mère à 10 mM).

- La chloroquine est un inhibiteur de l'autophagie (Nonoyama et al., 2019) et donc *a priori* de la lipophagie. Les solutions de chloroquine pour le traitement sont préparées dans de l'eau ultra pure stérile (solution mère à 10 mM).

6.2 – Expériences de culture en microplaques 12 puits

Une plage de concentration d'inhibiteurs de la dégradation des lipides a été testée sur les 2 ecotypes Pt1 et Pt4 de *P. tricornutum*, afin de déterminer si une dose inhibait la croissance des cultures. Les diatomées ont été cultivées en microplaques de 12 puits dans une enceinte de culture maintenue à 20°C et fournissant une lumière continue d'intensité 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Les cultures sontensemencées à 10^6 cellules/mL dans un volume de 3 mL. Les deux inhibiteurs sont ajoutés dans un volume de 30 μL de solution mère ou d'une solution fille, permettant de tester la gamme de concentrations finales suivantes : 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6 μM , 3 μM , 1,5 μM , 0,5 μM et 0,25 μM . Chaque concentration est mise en œuvre en triplicat. Un témoin en triplicat sur chaque plaque de 12 puits est traité avec 30 μL du DMSO pur (ATGlistatine) ou de l'eau ultra pure (chloroquine).

La densité cellulaire est suivie par mesure de l'absorbance à 750 nm dans les puits (Epoch 2 microplate reader, Biotek) après agitation de la plaque pendant 30 secondes.

6.3 – Expériences de resupplémentation avec les inhibiteurs de lipases

Les expériences en microplaques 12 puits ont permis de sélectionner des concentrations pour chaque inhibiteur et pour chaque écotype. Pour chaque condition, la concentration choisie était la dernière concentration de la gamme n'induisant pas d'inhibition de croissance : pour Pt1 3 μM pour l'ATGlistatine et 3 μM pour la chloroquine, pour Pt4 0,5 μM et 3 μM , respectivement. Ces concentrations correspondent aux dernières concentrations n'inhibant pas la croissance dans les microplaques. Des cultures de *P. tricornutum* Pt1 et Pt4 ont été soumises à une carence en azote (11 jours) suivie d'une resupplémentation en azote (N+C-, 72 heures) (**voir 1.3**).

Pour chaque souche et chaque inhibiteur, trois conditions en triplicats ont été définies : (1) témoin (T-), avec ajout d'eau ultra pure (chloroquine) ou de DMSO (ATGlistatine) aux moments de la mise en carence et de la resupplémentation, (2) traitement en carence (C), avec ajout du traitement au moment de la mise en carence, (3) traitement en resupplémentation (S), avec ajout d'eau ultra pure ou de DMSO au moment de la mise en carence et traitement au moment de la resupplémentation.

Pour chacune de ces trois conditions, des échantillons ont été prélevés pour réaliser des dosages biochimiques globaux : glucides solubles, protéines solubles et lipides neutres (**voir 2.3 et 2.4**).

7 – Analyses statistiques et visualisation des données

Les comparaisons de moyenne entre les groupes dans les différentes expériences ont été menées par des t-test (facteurs à deux modalités) ou des ANOVA à 1 facteur (facteurs à au moins 3 modalités) suivies d'un test post-hoc LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher. Les tests de normalités sur les données ont été effectués par un test de Shapiro-Wilks. Un seuil de $p\text{-value} \leq 0,05$ a été retenu comme seuil de significativité dans ces tests.

Les différences significatives obtenues dans les t-tests ont été représentées par des astérisques en fonction de la $p\text{-value}$: * ($0,01 < p\text{-value} < 0,05$), ** ($0,001 < p\text{-value} < 0,01$), *** ($p\text{-value} < 0,001$). Les résultats du test LSD ont été représentés par des lettres indiquant les niveaux des modalités comparées ($a > b > c > d$) : si un niveau est marqué « a », sa valeur est significativement supérieure à un niveau marqué « b ».

Pour certaines représentations graphiques (graphiques en violons et cartes de densité), le package R « ggplot2 » (<https://ggplot2.tidyverse.org/>) a été utilisé.

III – RÉSULTATS

1 – La comparaison de deux écotypes de *Phaeodactylum tricornutum* soumis à une carence en azote et une resupplémentation révèle des stratégies d'accumulation de lipides distinctes mais un processus de dégradation similaire

1.1 – Contexte et principaux résultats

Alors que la carence azotée est un mécanisme largement étudié et que les voies induites par celle-ci ont été identifiées par différentes approches omiques, les processus gouvernant la réponse à un retour de l'azote sont peu décrits chez *P. tricornutum* (Valenzuela et al., 2013; Jallet et al., 2020; Scarsini et al., 2022). Afin d'observer *in vivo* les processus mis en jeu lors de modifications des teneurs en azote dans le milieu de culture, nous avons mis en place une expérience de carence azotée (11 jours) suivie d'une resupplémentation (72 heures) couplée à des observations en microscopie confocale.

L'observation directe des LD après marquage par une molécule fluorescente (comme le Nile Red ou le BODIPY 505/515) est un outil qui a également été mis en œuvre dans quelques précédentes études pour observer leur formation et leur évolution au cours d'une carence en azote. Certaines études ont ainsi étudié l'écotype Pt4 de *P. tricornutum* (Wong and Franz, 2013; Leyland et al., 2020b) tandis qu'une autre a étudié l'écotype Pt1 (Jaussaud et al., 2020), montrant qu'il semblait y avoir des différences d'accumulation des LD entre les écotypes. Chez Pt1, de nombreuses LD apparaissent par populations successives, alors que chez Pt4, les lipides sont répartis dans une ou deux LD. Toutefois, ces études ayant été conduites dans des conditions de culture différentes, il n'est pas aisé de comparer leurs résultats. Une première étude en ce sens a été menée dans notre équipe (Scarsini et al., 2021) en se limitant à un point de temps où cette différence a été retrouvée. Afin d'affiner et de compléter ces observations, nous avons mené en parallèle la comparaison de Pt1 et Pt4 pendant l'expérience.

L'étude effectuée sur Pt1 (Jaussaud et al., 2020) a également émis l'hypothèse que le volume des cellules était un facteur limitant du volume maximal de LD et donc de l'accumulation des lipides. Ceci nous a conduit à également mesurer les dimensions des cellules présentes via des observations avec un microscope optique permettant d'obtenir un grand nombre d'observations. De plus, plusieurs études portant sur la carence azotée (Remmers et al., 2017; Huang et al., 2019; Scarsini et al., 2022) ont suggéré qu'une part des lipides de membrane du plaste est recyclée pour former des triglycérides. Le plaste a ainsi également été suivi par microscopie confocale via l'autofluorescence de la chlorophylle permettant une observation des thylakoïdes.

Ainsi, l'approche que nous avons mise en œuvre avait pour objectifs de comparer les écotypes Pt1 et Pt4 aussi bien en carence qu'en sortie de carence au niveau de leur volume cellulaire, du volume de leur plaste, des caractéristiques de leurs populations de LD, ainsi que des distances entre les deux compartiments. Ces caractéristiques permettent d'approfondir la

connaissance des processus d'accumulation et de consommation des lipides chez les deux écotypes. Trois principaux résultats ont été obtenus :

1 – Nous avons montré qu'en carence en azote les deux écotypes Pt1 et Pt4 accumulent progressivement des LD dont le volume par cellule augmente au cours du temps. Dans le même temps, la croissance s'arrête peu après le début de la carence possiblement suite à la consommation des réserves d'azote intracellulaires. De plus, le nombre de LD par cellule a indiqué qu'à partir d'une population basale de LD présentes en conditions non carencées, s'ajoute une nouvelle population de LD plus grandes dont le volume augmente progressivement tout en restant proches du plaste. Toutefois, des différences entre les écotypes ont pu être détectées. Le volume des LD atteint chez Pt4 est plus élevé que celui atteint chez Pt1, indiquant une plus forte accumulation de lipides neutres. Selon les écotypes, les caractéristiques de la population additionnelle de LD diffèrent, en accord avec les observations précédentes des phénotypes de chacun (Scarsini et al., 2021). Nous avons ainsi affiné la compréhension de l'accumulation des LD pendant la carence.

2 – Concernant les facteurs limitants de la carence, nous avons pu proposer une nouvelle hypothèse reliant le volume cellulaire et l'amplitude d'accumulation de LD via le volume du plaste avant carence. En effet, en carence comme après resupplémentation, les volumes de LD et des thylakoïdes évoluent en sens inverse : tandis que les LD augmentent en volume pendant la carence, le volume des thylakoïdes diminue et inversement en sortie de carence. Cette observation est cohérente avec la diminution de la photosynthèse décrite dans la littérature et avec le recyclage de composants du plaste. Chez Pt4, le volume des thylakoïdes avant carence est plus élevé que chez Pt1. L'estimation du volume cellulaire a de plus mis en évidence que Pt4 a des cellules plus grandes que Pt1. Ces observations sont *a priori* en accord avec un volume cellulaire comme facteur limitant de l'accumulation des lipides (Jaussaud et al., 2020). Toutefois, en remarquant que les cellules de volume plus important ont également le plaste le plus volumineux, et en nous fondant sur l'implication du recyclage des lipides de membrane des thylakoïdes dans l'accumulation des TG, nous avons énoncé une seconde hypothèse : les cellules les plus volumineuses pourraient avoir une accumulation plus importante de lipides du fait d'une quantité plus importante de lipides de membrane du plaste à recycler.

3 – Enfin, durant la période de resupplémentation, nous avons décrit un processus de fragmentation des LD. En effet, les volumes des LD et des thylakoïdes sont retournés à leur valeur initiale non carencée en moins de 72 heures. Dans le même temps, l'examen du nombre de LD par cellule dans les premières 24 heures a mis en évidence une forte augmentation. Ces deux éléments observés chez les deux écotypes ont permis de déduire que le volume

individuel par LD diminuait, traduisant une fragmentation précédant la consommation des lipides. La mesure de la distance entre les LD et le plaste a de plus permis de décrire un éloignement des LD par rapport au plaste. Cet éloignement signifie également que ces LD sont dégradées à distance de la mitochondrie, principal lieu de la β -oxydation (Jallet et al., 2020), car elle est étroitement accolée au plaste (Flori et al., 2017; Uwizeye et al., 2021). Nous avons donc mis en avant l'hypothèse qu'une part significative de la consommation des lipides pourrait impliquer la lipophagie dans les vacuoles de la cellule.

1.2 – Article 1

Article publié :

Murison, V.; Hérault, J.; Côme, M.; Guinio, S.; Lebon, A.; Chamot, C.; Bénard, M.; Galas, L.; Schoefs, B.; Marchand, J.; Bardor, M.; Ulmann, L. Comparison of two *Phaeodactylum tricornutum* ecotypes under nitrogen starvation and resupply reveals distinct lipid accumulation strategies but a common degradation process. *Front. Plant Sci.* 2023, 14, 1257500. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1257500>.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Ugo Cenci,
Lille University of Science and Technology,
France

REVIEWED BY

Juliette Salvaing,
Institut National de recherche pour
l'agriculture, l'alimentation et
l'environnement (INRAE), France
Denis Jallet,
Institut Biotechnologique de Toulouse
(INSA), France

*CORRESPONDENCE

Lionel Ulmann

✉ lionel.ulmann@univ-lemans.fr

RECEIVED 12 July 2023

ACCEPTED 04 September 2023

PUBLISHED 22 September 2023

CITATION

Murison V, Hérault J, Côme M, Guinio S,
Lebon A, Chamot C, Bénard M, Galas L,
Schoefs B, Marchand J, Bardor M
and Ulmann L (2023) Comparison of
two *Phaeodactylum tricornutum*
ecotypes under nitrogen starvation
and resupply reveals distinct lipid
accumulation strategies but a common
degradation process.
Front. Plant Sci. 14:1257500.
doi: 10.3389/fpls.2023.1257500

COPYRIGHT

© 2023 Murison, Hérault, Côme, Guinio,
Lebon, Chamot, Bénard, Galas, Schoefs,
Marchand, Bardor and Ulmann. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Comparison of two *Phaeodactylum tricornutum* ecotypes under nitrogen starvation and resupply reveals distinct lipid accumulation strategies but a common degradation process

Victor Murison¹, Josiane Hérault¹, Martine Côme¹,
Sabrina Guinio¹, Alexis Lebon², Christophe Chamot²,
Magalie Bénard², Ludovic Galas², Benoît Schoefs³,
Justine Marchand³, Muriel Bardor⁴ and Lionel Ulmann^{1*}

¹Biology of Organisms, Stress, Health and Environment, IUT Département Génie Biologique, Le Mans Université, IUML-FR 3473 CNRS, Laval, France, ²Université de Rouen Normandie, INSERM, CNRS, HeRaLeS US51 UAR2026, PRIMACEN, Rouen, France, ³Biology of Organisms, Stress, Health and Environment, UFR Sciences et Techniques, Le Mans Université, IUML-FR 3473 CNRS, Le Mans, France, ⁴Université de Rouen Normandie, Laboratoire GlycoMEV UR4358, SFR Normandie Végétal FED 4277, Innovation Chimie Carnot, Rouen, France

Introduction: *Phaeodactylum tricornutum* is a model species frequently used to study lipid metabolism in diatoms. When exposed to a nutrient limitation or starvation, diatoms are known to accumulate neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets (LDs). Those lipids are produced partly de novo and partly from the recycle of plastid membrane lipids. Under a nitrogen resupply, the accumulated lipids are catabolized, a phenomenon about which only a few data are available. Various strains of *P. tricornutum* have been isolated around the world that may differ in lipid accumulation patterns.

Methods: To get further information on this topic, two genetically distant ecotypes of *P. tricornutum* (Pt1 and Pt4) have been cultivated under nitrogen deprivation during 11 days followed by a resupply period of 3 days. The importance of cytoplasmic LDs relative to the plastid was assessed by a combination of confocal laser scanning microscopy and cell volume estimation using bright field microscopy pictures.

Results and discussion: We observed that in addition to a basal population of small LDs (0.005 μm^3 to 0.7 μm^3) present in both strains all along the experiment, Pt4 cells immediately produced two large LDs (up to 12 μm^3 after 11 days) while Pt1 cells progressively produced a higher number of smaller LDs (up to 7 μm^3 after 11 days). In this work we showed that, in addition to intracellular available

space, lipid accumulation may be limited by the pre-starvation size of the plastid as a source of membrane lipids to be recycled. After resupplying nitrogen and for both ecotypes, a fragmentation of the largest LDs was observed as well as a possible migration of LDs to the vacuoles that would suggest an autophagic degradation. Altogether, our results deepen the understanding of LDs dynamics and open research avenues for a better knowledge of lipid degradation in diatoms.

KEYWORDS

diatom, *Phaeodactylum*, lipid droplet, lipid catabolism, chloroplast, stress, nitrogen

1 Introduction

Microalgae are photosynthetic microorganisms contributing to around 50% of global primary production as the main aquatic ecosystems producers (Benoiston et al., 2017). Under the same word, microalgae include a high diversity of genetically and physiologically distant phenotypic groups (Burki et al., 2020). One major phylum is the Stramenopiles, a vast group that is believed to have arisen through secondary endosymbiosis, *i.e.* after a red alga was engulfed and conserved as a plastid by an heterotroph cell (Grosche et al., 2014). This peculiar evolutionary origin resulted in a specific intracellular organization and a set of original metabolic pathways in these organisms, including diatoms (*Bacillariophyceae*). From the organization point of view, the most striking originality concerns the chloroplast that is delineated by four membranes, the outermost being continuous with the endoplasmic reticulum (ER) (Flori et al., 2016). From the metabolic point of view, diatoms possess a mixture of animal- and plant-like metabolisms such as the urea cycle and the fatty acid synthesis in the plastid (Allen et al., 2011; Zulu et al., 2018; Butler et al., 2020).

Diatom lipid metabolism raised a lot of research interest because some oleaginous species can accumulate up to 69% of their biomass as lipids (Sayanova et al., 2017), making them a possible feedstock for the production of biofuels (Mourya et al., 2022). Indeed, many diatom species possess a highly flexible carbon metabolism as an adaptation to environment variations. When exposed to a variety of stresses, including nutrient starvation (Abida et al., 2015; Alipanah et al., 2015; Alipanah et al., 2018; Heydarizadeh et al., 2019; Huang et al., 2019; Scarsini et al., 2021; Scarsini et al., 2022), changes in light quality (Sharma et al., 2020; Duarte et al., 2021), and the presence of reactive oxygen and nitrogen species (Burch and Franz, 2016; Dolch et al., 2017), diatoms reorient the carbon metabolism toward the production of energy-rich neutral lipids. These molecules are packed inside specialized and dynamic storage organelles, the lipid droplets (LDs) (Leyland et al., 2020a).

The accumulation of lipids in diatoms has been well characterized. It occurs by two main routes. First, fatty acids can

be synthesized *de novo* in the plastid and then incorporated in triacylglycerol (TAG) in the ER. Secondly, the fatty acid chains of membrane lipids (including plastidial lipids) can be recycled by incorporation in TAG in the ER. Then, LDs would bud from this organelle. While the enzymes involved in these processes have been identified and partially characterized (Zulu et al., 2018), those associated with transport mechanisms as well as lipid degradation pathways remain to be described. By homology to other eukaryotes, it is hypothesized that lipids are degraded by two processes, lipolysis and lipophagy (Kong et al., 2018). Both processes imply the action of lipases to hydrolyze TAG into fatty acids and glycerol. In lipolysis, the enzymes get a direct access to lipids from the surface of LDs. By contrast, in lipophagy, whole fragments of LDs are digested in the vacuole by autophagy (Kong et al., 2018; Zienkiewicz and Zienkiewicz, 2020). Currently, only a few lipases have been characterized in diatoms (Trentacoste et al., 2013; Barka et al., 2016; Li et al., 2018; Shu et al., 2023) and many more remain to be studied, including some possibly localized in the vacuoles (Murison et al., 2023).

Hence, the lipid metabolism in diatoms is tightly linked to their complex intracellular organization. A few studies have focused on how LDs are formed during lipid accumulation by examining the number and volumes of LDs marked with a fluorescent probe in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* under a nitrogen (N) starvation (Wong and Franz, 2013; Jaussaud et al., 2020; Leyland et al., 2020b; Scarsini et al., 2021). The two studies conducted on the Pt4 ecotype revealed a stable number of LDs during the starvation (Wong and Franz, 2013; Leyland et al., 2020b). In contrast, in Pt1 ecotype LDs accumulated in successive subpopulations, with a first subpopulation appearing in the first days of starvation and growing to a maximum volume, before the formation of two other subpopulations in which LD volume progressively increase until lipid accumulation is limited by cytosolic space availability (Jaussaud et al., 2020). A first comparison of Pt1 and Pt4 LDs characteristics was carried out after 18 days of N starvation, retrieving the general features previously identified in each ecotype and highlighting that Pt4 cells are larger than Pt1 ones (Scarsini et al., 2021). However, this study did not assess the dynamics of LDs accumulation and cell volume along the

starvation. Additionally, how these ecotypes consume their different LDs once nitrogen is resupplied is currently unknown.

To understand further the above-described phenomena, we investigated the strategies of LDs accumulation in *P. tricornutum* Pt1 and Pt4 ecotypes and monitored their degradation dynamics under N starvation and N resupply. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and bright field microscopy allowed us to decipher the lipid accumulation and degradation strategies of two genetically distant ecotypes of *P. tricornutum*. Finally, we also questioned the relationship existing between cell volume and the amplitude of lipid accumulation.

2 Materials and methods

2.1 Cultivation conditions of *Phaeodactylum tricornutum*, nitrate starvation and resupply and growth monitoring

Triplicate non agitated cultures of *P. tricornutum* ecotypes Pt1 and Pt4 (respectively CCMP 2561 and UTEX 646) were conducted. Cells were grown in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of autoclaved *f/2* medium (Guillard and Ryther, 1962). Cultures were inoculated at a cellular density of approximately 10^5 cells/mL. Temperature was maintained at 19°C and light intensity was provided at $55 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ with daylight fluorescent tubes (LuxLine Plus T8 F58W/865 G13, Sylvania Lighting) following a light-dark cycle of 16h-8h. This growth intensity was chosen because it allowed to drive similar relative electron transport rates in the different strains studied here as determined by tracing Photosynthesis-Irradiance (PI) curves using a Dual-PAM 100 (Walz, Germany) operated with the default routine (Supplementary Data S1).

After a 7 days-period of N replete growth in *f/2* medium, cells were transferred to a *f/2* nitrogen free medium (N_0) for 11 days. For each ecotype, the content of each Erlenmeyer flask was centrifuged at $2,000\times g$ for 15 min and washed twice with N_0 medium. Triplicates were then resuspended in fresh N_0 medium and finally pooled in one sterile bottle before being equally redistributed between three new sterile 500 mL Erlenmeyer flasks in a final volume of 200 mL of N_0 . After the 11 days period of N starvation, a N resupply experiment of 72 hours was conducted by adding in each flask $0.006 \text{ mg NaNO}_3/10^6$ cells/day, according to the upper bound of NO_3^- uptake by *P. tricornutum* cells determined in Levering et al. (2016). Samples were harvested at 6 timepoints: right after the medium is changed to N_0 (D0), after 3, 7 and 11 days of N starvation (D3, D7, D11) and after 24 and 72 hours post N resupply (h24 and h72). All samples were collected at the same hour in the morning to limit circadian influence between timepoints. To prevent carbon limitation, the medium was supplemented with 7.5 mL/L of NaHCO_3 (8%) upon initiation of the culture and after the switch to N_0 medium. Cell density variations were monitored by counting the cells with a Malassez hemocytometer.

2.2 Staining with BODIPY 505/515 and confocal imaging

Living cells of Pt1 and Pt4 were stained with BODIPY 505/515 at a final concentration of $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ in DMSO. After staining, $10 \mu\text{L}$ of culture were sedimented during 5 min on a glass slide and covered with a glass coverslip.

Cells were observed with a Leica TCS SP8 upright confocal microscope equipped with a $\times 63$ oil-immersion objective (Leica Microsystems, Nanterre, France). Chlorophyll and BODIPY 505/515 were excited at 488 nm, and light was collected on three channels: one photomultiplier detector for transmitted light, and two hybrid detectors operated in “counting” mode for the fluorescence emitted by BODIPY 505/515 (em: 505-550 nm) and chlorophyll (em: 650-700 nm). Images were acquired as 3D images (xyz) with a step size of $0.1 \mu\text{m}$ between slices in the z dimension, and a zoom factor of $\times 2.5$. In this manuscript, chlorophyll autofluorescence is displayed in magenta while BODIPY fluorescence is displayed in green.

2.3 Confocal image analysis and 3D modelling of plastid and lipid droplets

Raw images from confocal acquisitions were processed through deconvolution with the software Huygens professional 4.5.1 (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands). Deconvoluted images were further processed using Fiji freeware (ImageJ) to adjust brightness and contrast of each channel and produce maximum intensity projections on the z axis.

Deconvoluted images were also used as input for 3D modelling of LDs and of the area where chlorophyll fluorescence was detected (*i.e.* thylakoids) with IMARIS 9.0 (Oxford Instruments, United Kingdom). Cells were individually selected when images contained multiple cells. Then, for each cell, 3D volumes were created for each LD and for thylakoids using values of the “smooth” and “background” parameters specific for thylakoids (respectively $0.3 \mu\text{m}$ and $0.2 \mu\text{m}$), Pt1 LDs (respectively $0.1 \mu\text{m}$ and $0.2 \mu\text{m}$) and Pt4 LDs (respectively $0.1 \mu\text{m}$ and $0.4 \mu\text{m}$), so that the model matches the signal. The splitting of touching objects was also allowed. To prevent false positive modelling, the transmitted light channel was used to visualize the limits of each cell and remove objects eventually found outside the cells. Finally, the volume and the barycenter coordinates of each object were retrieved.

Various parameters were derived from the modelled LDs for each cell: the number of LDs, the sum of individual LD volumes (total LD volume), the fraction of total LD volume that is occupied by each individual LD and the Euclidian distance from each LD to the plastid of their cell calculated according to equation 1.

$$\text{Distance}_{\text{LD-plastid}} = \sqrt{(x_{\text{LD}} - x_{\text{P}})^2 + (y_{\text{LD}} - y_{\text{P}})^2 + (z_{\text{LD}} - z_{\text{P}})^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

where x_{LD} , y_{LD} , z_{LD} and x_{P} , y_{P} , z_{P} are the spatial coordinates of the corresponding LD and the plastid barycenters.

2.4 Quantification of chlorophyll content

For pigment extraction, 2 mL of culture volume were harvested by centrifugation (14,500×g, 10 min, 4°C) and then submitted to mechanical lysis (TissueLyser LT, Qiagen, Les Ulis, France). Acid-washed glass beads (425–600 μm, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and a volume of 500 μL of 90% acetone were added to the pellet for a first cycle of lysis (50 Hz, 1 min). The extract was centrifuged (14,500×g, 5 min) and the supernatant collected in a new tube conserved on ice. Lysis cycles were then repeated with the addition of 500 μL of 90% acetone until the pellet became white. An absorbance spectrum between 400–800 nm was acquired from each final extract (UV 1900i double-beam UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Noisiel, France) and the chlorophyll *a* and chlorophyll *c* (c_1+c_2) concentrations were calculated according to Jeffrey and Humphrey (1975). All chemicals were of analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.5 Bright field microscopy for the determination of cell volumes

Images of *P. tricornutum* populations were acquired with a Zeiss Cell Discoverer 7 inverted microscope (Carl Zeiss France, Rueil-Malmaison, France). Cells from each sample were deposited in a well of a 24 well glass-bottom microplate and covered by a glass coverslip. Images were acquired with a ×50 water-immersion objective and a tube lens magnification of 0.5. Two mosaics of 5×5 images were collected for each sample.

Image analysis was automated with a homemade macro due to the large number of cells in the images. ImageJ plugin “Trainable Weka Segmentation” (Arganda-Carreras et al., 2017) was used to separate cells from the background in each image by machine learning algorithms. For the training phase, an image was randomly selected from the dataset. Around 20% of cells present in the image were registered manually in a “Cells” category, while an equal number of areas outside the cells were included in a distinct “Background, debris and bubbles” category. Training was performed using 3 filters, a Sobel filter for edge detection, a Maximum filter for texture detection and a Gabor filter detecting both edge and texture. The obtained classifier was used to create a probability map from each image, displaying the probability for each pixel to belong to a cell or to the background. The probability map was used as an input for the “Analyse particle” tool of ImageJ with a measurement of “Area”, “Shape descriptors”, “Fit ellipse” and “Feret’s diameter”, and a filtering by area (25 to 200 μm²) and by circularity (0 to 0.4). A further screening using shape descriptors “AR (Aspect Ratio)”, “Roundness” and “Solidity” (respective parameter values “≥3”, “≤0.3”, “≥0.55” for Pt1 and “≥3.5”, “≤0.3”, “≥0.5” for Pt4) was applied to eliminate false positives. Finally, the width of each cell was retrieved by taking the minor axis of an ellipse fitted to each cell area, and the length was retrieved as the Feret diameter of the cell shape.

Volume was then estimated using a prolate spheroid model (Hillebrand et al., 1999) with equation 2.

$$\text{Estimated volume} = \frac{\pi}{6} \times \text{Width}^2 \times \text{Length} \quad (\text{Eq. 2})$$

where width and length are in μm, and estimated volume is in μm³.

2.6 Statistical analysis and graphical rendering

Comparison of the means within an ecotype was carried out using a one-way ANOVA test with the sampling time defined as the varying factor with 6 modalities (“D0”, “D3”, “D7”, “D11”, “h24” and “h72”) after controlling the normality of the data with a Shapiro-Wilks test. A pairwise post-hoc Fisher’s LSD test was used to define the levels of each modality as compared to the others and denote them with letters (a > b > c > d). Comparisons of the means between ecotypes were conducted using a *t*-test. In all cases, a *p*-value < 0.05 was retained as a criterion for statistical significance. For *t*-tests, magnitude of the *p*-value is rendered on the figures with one (*, 0.01 < *p*-value < 0.05), two (**, 0.001 < *p*-value < 0.01) or three (***, *p*-value < 0.001) asterisks.

The R package “ggplot2” (<https://ggplot2.tidyverse.org/>) was used for tracing violin plots and density maps. For box and whiskers plots, the delimitations were those of “ggplot2”: the line inside the box is the median, the ends of the box are the first and third quartile while the ends of the whiskers are the lowest (respectively highest) value between maximum (minimum) and Q3 + 1.5 × [interquartile range] (Q1 - 1.5 × [interquartile range]).

3 Results

The experimental design implemented for this study allows following the differential response of *P. tricornutum* Pt1 and Pt4 cells to a nitrogen (N) starvation (11 days) followed by a N resupply (72 hours).

3.1 Effects of varying nitrogen availability on the growth of *Phaeodactylum tricornutum* Pt1 and Pt4

The cell growth dynamics of the cultures are similar between ecotypes (Figure 1). The N replete conditions preculture permit exponential growth with division rates of 0.73 day⁻¹ and 0.70 day⁻¹ for Pt1 and Pt4, respectively. Cell division was halted by the switch to N₀ medium that allowed only one doubling of cell density between D0 and D3, followed by a transient stand-by phase until D11 when N resupply resumed cell division, achieving approximately one doubling of cell density within 72 hours.

3.2 Evolution of intracellular organization during nitrogen starvation and resupply

CLSM observations were performed at the different time points of N starvation and N resupply phases to follow the cell general shape and chloroplast and LD locations in both ecotypes, based on chlorophyll and BODIPY 505/515 fluorescence (Figures 2, 3 and S1). Representative cells from 24-37 cells observed per time point, are displayed in Figures 2, 3.

Regardless of the N supply, the chlorophyll autofluorescence image suggests the presence of a single elongated plastid in each cell meaning that the photosynthetic apparatus was maintained, at least partially (Figures 2, 3 and S1).

The most spectacular observed modification is the LDs dynamics with variation in both number and size of LDs. At D0, cells from both ecotypes contain a lower number of smaller LDs by comparison to those at D3 to D11. With regards to the N resupply, cells contained a large number of small LDs only 24 hours after the N resupply, which could indicate a fragmentation of the large LDs accumulated during starvation. At 72 hours after the N resupply, cells appeared to have returned to a similar state than at D0.

3.3 Nitrogen starvation induces an increase of lipid droplet volume along with a reduction in thylakoids while nitrogen resupply promotes a fast metabolic reversal

CLSM data allowed us to trace the evolution of the thylakoid and LD volumes per cell along the N starvation and N resupply experiment (Figure 4).

In both ecotypes, the volumes of these two subcellular compartments clearly followed opposite trends. During N

starvation, thylakoids volume decreased while LD total volume increased. Under N resupply, cells experienced a very fast response, with thylakoids and LD volumes returning to an N replete (D0) value within 72 hours. When comparing ecotypes, Pt4 had a higher initial thylakoids volume. The Pt4 ecotype also reached a higher LD volume per cell than Pt1.

The effects of the N starvation and resupply on the thylakoids were further assessed by a total chlorophyll content assay (Figure 5A). Indeed, thylakoids volume and chlorophyll content were found to be linearly correlated (Figure 5B).

3.4 Ecotypes display highly different cell volumes that vary upon nitrogen starvation and resupply

One parameter that could explain the observed differences in lipid accumulation is the difference in cell volume between the two ecotypes. Under CLSM, we observed that in either N starvation or N resupply sampled Pt4 cells were longer than those of Pt1 with a length of $\sim 30\mu\text{m}$ and $\sim 20\mu\text{m}$, respectively (Figures 2, 3). To go further, cell dimensions, i.e., length and width, were measured using bright field microscopy by sampling 2500-8000 cells per timepoint. Images were then processed automatically to retrieve dimensions of each cell and to estimate their volume using a prolate spheroid approximation of cell shape (Hillebrand et al., 1999).

The evolution of length, width, and volume of Pt1 and Pt4 cells along the 6 sampling points of the experiment are presented in Table S1. The two ecotypes clearly presented distinct ranges of variations, with width in the range 3.5-4 μm for Pt1 and 4-4.4 μm for Pt4, and length in the range 22.6-23.5 μm for Pt1 and 27.7-28.6 μm for Pt4. Hence, as observed by CLSM (Figures 2, 3), Pt4 cells are overall larger than those of Pt1 (Table S1). It must be noted that each population contain cells of highly variable size (Table S1, Figure 6).

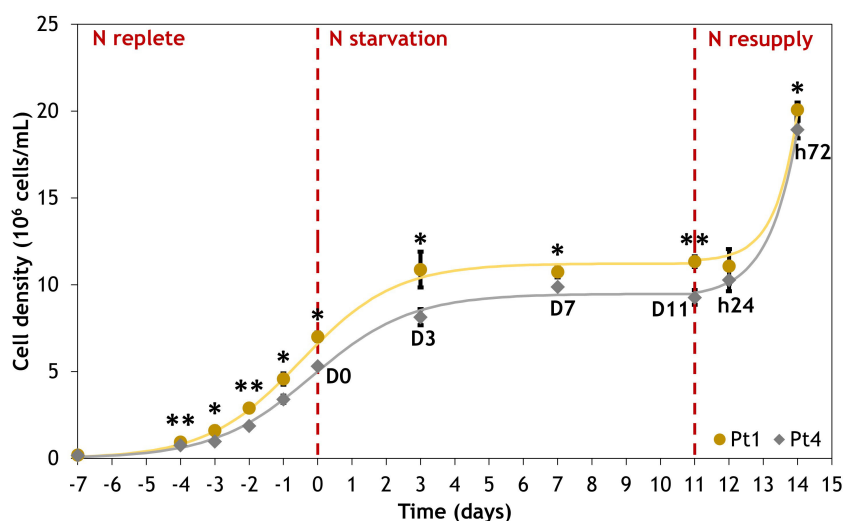


FIGURE 1

Evolution of cell density for *Phaeodactylum tricornutum* ecotypes Pt1 (yellow) and Pt4 (grey) under N replete, N starvation and N resupply conditions. Asterisks denote a difference between the two ecotypes (t-test: *0.01 < p-value < 0.05; **0.001 < p-value < 0.01). Each point is a Mean \pm Standard deviation (n = 3).

Along the experiment, mean cell volumes were not constant (Table S1; Figure 6, see significance letters). During N starvation, the mean volume decreases significantly for both ecotypes, going from 199 to 158 μm^3 and from 278 to 258 μm^3 between D0 and D11 for Pt1 and Pt4, respectively. While Pt4 mean cell volume immediately decreased to reach a “stand-by” minimum from D3 until D11, Pt1 cell volume decreased more progressively (Figure 6). At 24 hours after

N resupply, cells of both strains experienced a significant transient increase in volume, reaching 171 μm^3 and 300 μm^3 for Pt1 and Pt4 respectively. At 72 hours after N resupply, the mean volumes of both types of cells decrease again. By tracing volume as a function of width and length, the variation in volume appeared to be driven by both width ($R^2 = 0.98$) and length ($R^2 = 0.78$) in Pt1 while only width ($R^2 = 0.94$) was correlated to volume in Pt4 (Figure S2).

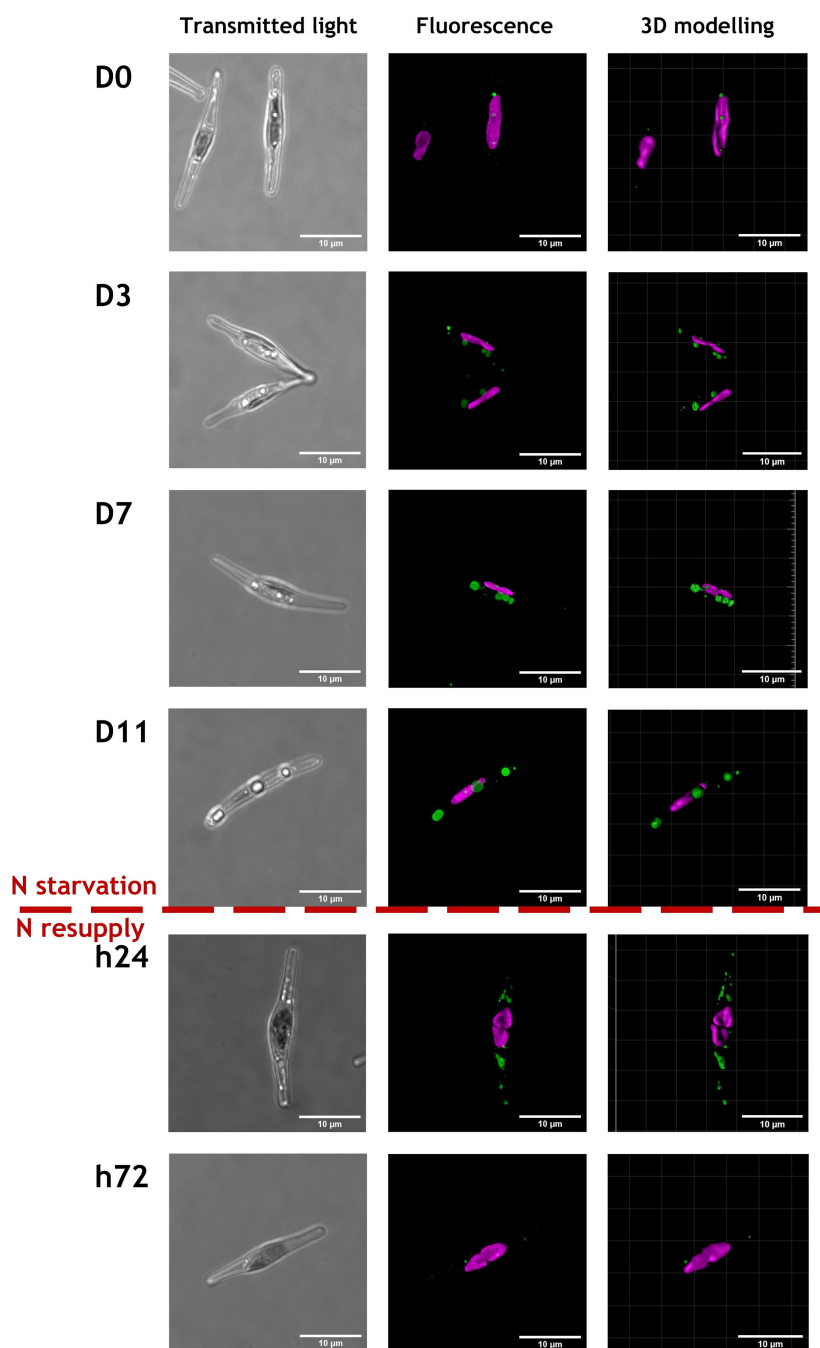


FIGURE 2
 Representative images of cells from Pt1 ecotype during a nitrogen (N) starvation of 11 days followed by a N resupply of 3 days. Chlorophyll autofluorescence (650-700 nm) and Bodipy 505-515 fluorescence (505-550 nm) are displayed in magenta and green, respectively. Cells were selected from an overall number of 28, 25, 25, 24, 30 and 37 cells at respective timepoints from D0 to h72. The scale bar measures 10 μm .

3.5 Pt1 and Pt4 cells accumulate lipid droplets on distinct modes but degrade them similarly

CLSM data also provided insights into how lipids are distributed between LDs inside each cell. Indeed, it was previously described that Pt4 cells accumulate their lipids in two large LDs while Pt1 cells would form a higher number of smaller LDs (Leyland

et al., 2020b; Scarsini et al., 2021). To assess these accumulation patterns, we defined the proportion of total LD volume comprised in the two largest LDs as an indicator for characterizing the inequality of lipid distribution between LDs in a cell. This indicator would tend to 100% when the majority of lipids is concentrated in only two LDs (very inequalitarian) while a lower value would indicate a repartition between a higher number of LDs (Figure 7).

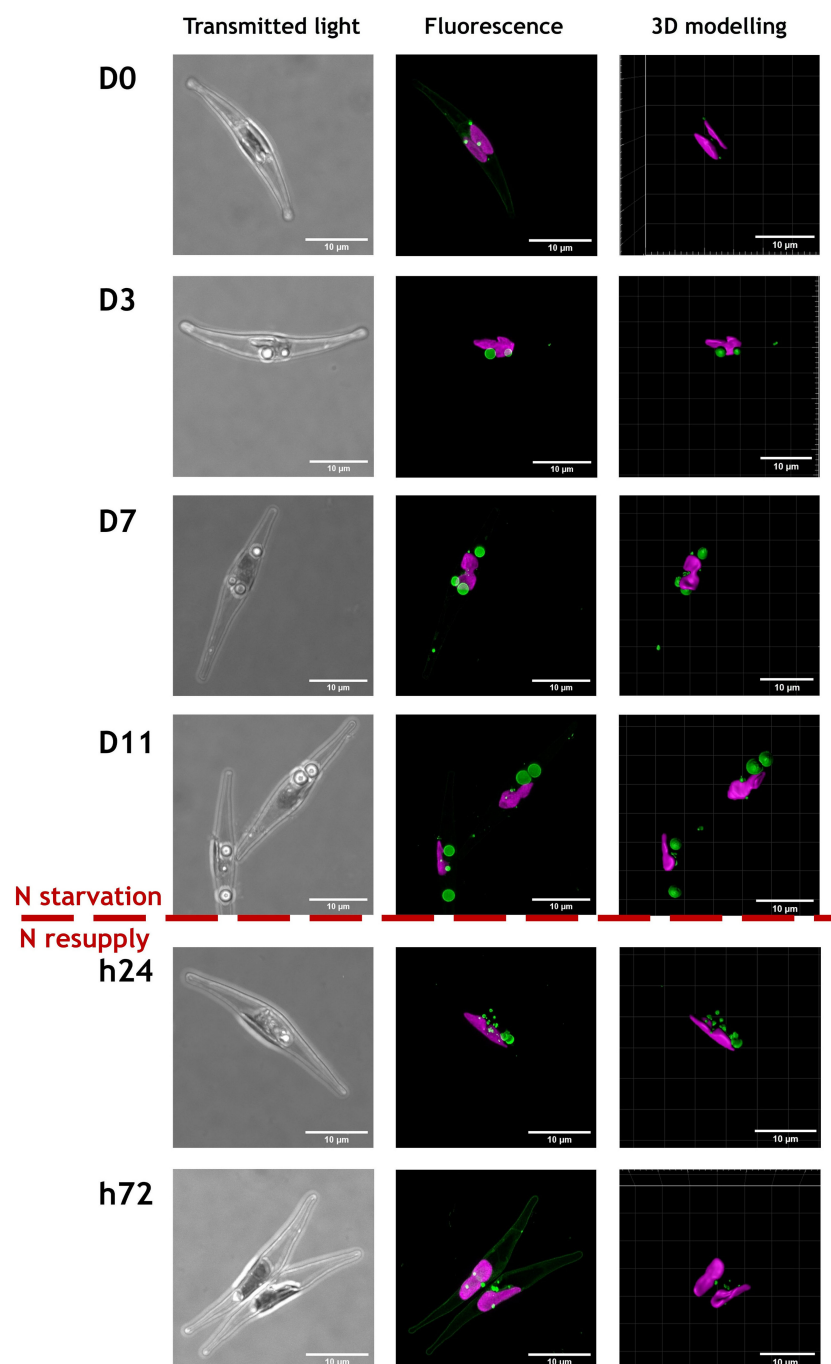


FIGURE 3

Representative images of cells from Pt4 ecotype during a nitrogen (N) starvation of 11 days followed by a N resupply of 3 days. Chlorophyll autofluorescence (650–700 nm) and Bodipy 505–515 fluorescence (505–550 nm) are displayed in magenta and green, respectively. Cells were selected from an overall number of 26, 24, 27, 26, 28 and 29 cells at respective timepoints from D0 to h72. The scale bar measures 10 µm.

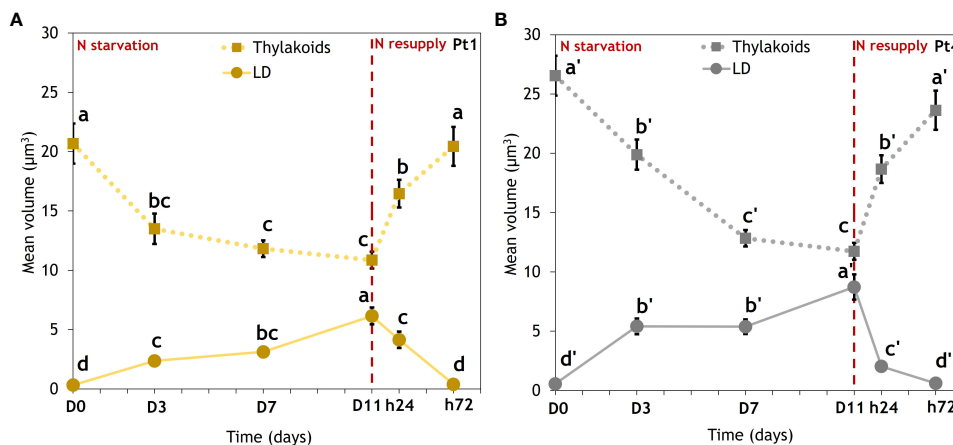


FIGURE 4 Evolution of thylakoids mean volume (dotted lines) and mean total volume of lipid droplets (solid lines) in cells of (A) Pt1 and (B) Pt4. Volumes were measured on 28, 25, 25, 24, 30 and 37 cells for Pt1 and 26, 24, 27, 26, 28 and 29 cells for Pt4 at respective timepoints from D0 to h72. Letters show differences between means at each time of sampling (ANOVA, p -value<0.05, LSD post-hoc test $a>b>c>d$ (Pt1) and $a'>b'>c'>d'$ (Pt4)). Each value is a Mean \pm Standard error ($n = 24$ -37).

At D0, the value of the inequality indicator suggests that the total volume of lipid droplets was shared between more than two LDs for both ecotypes. However, during N starvation, i.e when lipid accumulated, Pt4 cells concentrated most of their neutral lipids in the two largest LDs (median at ~90%), while Pt1 cells displayed a more equalitarian distribution between LDs (median at 60-75%).

As observed in Figures 2, 3, the N resupply induced an increase in LD cellular quota and a decrease in LD individual size as compared to N starvation, suggesting a possible fragmentation of the large LDs formed during N starvation. To further investigate this phenomenon, the number of LDs per cell was followed during the whole experiment (Figure 8).

The two ecotypes followed similar patterns. At the beginning of N starvation (between D0 and D3), the number of LDs increased

because of the formation of additional LDs (Figures 2, 3, 8). The LD cell quota value remained stable along lipid accumulation suggesting that the LDs are progressively filled with the *de novo* produced lipids. At 24 hours after starting N resupply, the LDs cell quota increased transiently, returning to the same situation as that of D0 at t72 for Pt1, while for Pt4, a slightly higher quota is observed at t72 as compared to D0 (Figure 8). The increase of the number of LDs per cell at h24 occurred while the total cellular LD volume decreased, suggesting that the numerous small LDs formed during h24 arose from the fragmentation of the few large LDs that were existing at the end of the N starvation period. This scenario is indeed supported by the variations of the individual mean LD volume (Table 1).

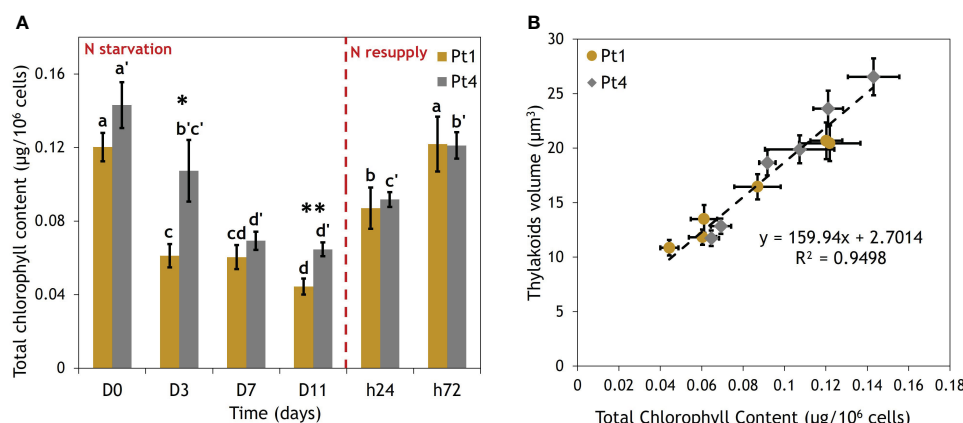


FIGURE 5 Correlation between thylakoids volume and total chlorophyll content per cell of Pt1 and Pt4 measured during a nitrogen (N) starvation followed by a N resupply. (A) Evolution of chlorophyll content, (B) Correlation between thylakoids volume and total chlorophyll content. Thylakoid were measured on 28, 25, 25, 24, 30 and 37 cells for Pt1 and 26, 24, 27, 26, 28 and 29 cells for Pt4 at respective timepoints from D0 to h72. Asterisks denote a difference between ecotypes (t-test: *0.01< p -value< 0.05; **0.001< p -value< 0.01), letters show differences between means at each time of sampling [ANOVA, p -value<0.05, LSD post-hoc test $a>b>c>d$ (Pt1) and $a'>b'>c'>d'$ (Pt4)]. (A) Each value is a Mean \pm Standard deviation ($n = 3$). (B) Thylakoid volume values are from Figure 4.

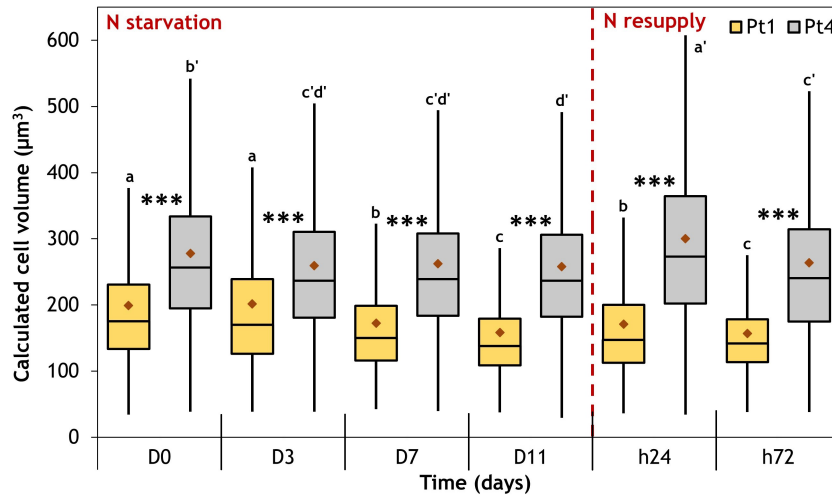


FIGURE 6
Cell volume variation in the populations of Pt1 (yellow) and Pt4 (grey) ecotypes measured during a nitrogen (N) starvation followed by a N resupply. Plots are traced from the cell volumes calculated for 4161, 4999, 6609, 7035, 7887 and 4919 cells of Pt1 and 2517, 4820, 5997, 5406, 6867 and 3807 cells of Pt4 at respective timepoints from D0 to h72. Asterisks denote a difference between ecotypes (t-test: *0.01< p-value< 0.05; **0.001< p-value< 0.01; ***p-value< 0.001), letters show differences between means at each time of sampling [ANOVA, p-value<0.05, LSD post-hoc test a>b>c (Pt1) and a'>b'>c'>d' (Pt4)]. Box and whiskers plot: values plotted as given by R package ggplot2, the red diamond inside the plot is the mean.

3.6 The distribution of lipid droplet volumes reveals the presence of two dynamic populations

As the LD cellular quota changed over the timepoints of the experiment (Figure 8), and that the repartition of volumes between

LDs during the accumulation varies along the experiment for both ecotypes (Figure 7), the distribution of individual LD volumes along the N starvation and N resupply periods was traced to investigate patterns of LD accumulation (Figure 9).

Both ecotypes displayed an initial population of small LDs at D0. Then, during N starvation, a second population of large LDs

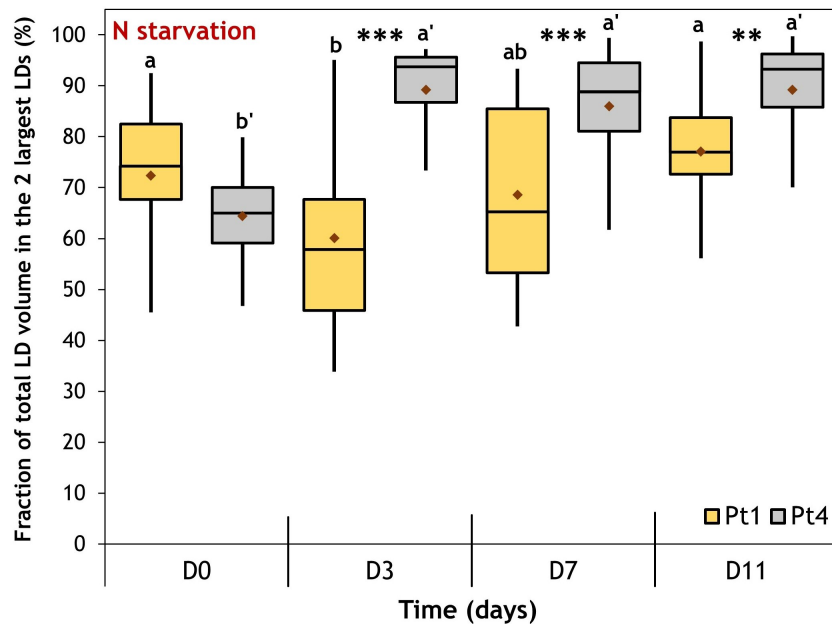


FIGURE 7
Evolution of the fraction of the total lipid volume per cell occupied by the 2 largest LDs during a nitrogen (N) starvation in Pt1 (yellow) and Pt4 (grey) ecotypes. Plots are traced from the fractions calculated for cells containing at least 3 LDs i.e. 18, 24, 24 and 23 cells of Pt1 and 12, 18, 23 and 23 cells of Pt4 at respective timepoints from D0 to D11. Asterisks denote a difference between ecotypes (t-test: *0.01< p-value< 0.05; **0.001< p-value< 0.01; ***p-value< 0.001), letters show differences between means at each time of sampling [ANOVA, p-value<0.05, LSD post-hoc test a>b (Pt1) and a'>b' (Pt4)]. Box and whiskers plot: values plotted as given by R package ggplot2, the red diamond inside the plot is the mean.

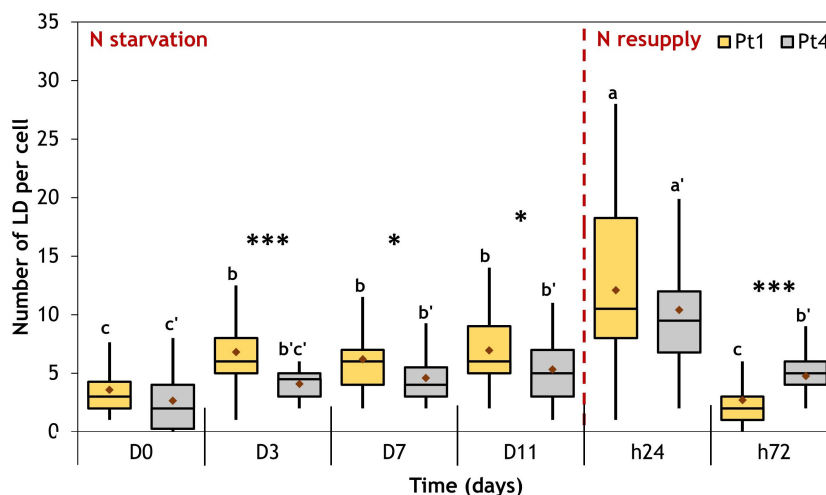


FIGURE 8
 Evolution of the number of LD per cell during a nitrogen (N) starvation followed by a resupply in Pt1 (yellow) and Pt4 (grey) ecotypes. Plots are traced from the numbers of LDs collected in 28, 25, 25, 24, 30 and 37 cells for Pt1 and 26, 24, 27, 26, 28 and 29 cells for Pt4 at respective timepoints from D0 to h72. Asterisks denote a difference between ecotypes (t-test: *0.01<p-value<0.05; **0.001<p-value<0.01; ***p-value<0.001), letters show differences between means at each time of sampling [ANOVA, p-value<0.05, LSD post-hoc test a>b>c (Pt1) and a'>b'>c' (Pt4)]. Box and whiskers plot: values plotted as given by R package ggplot2, the red diamond inside the plot is the mean.

appeared, progressively in Pt1 and immediately in Pt4. Finally, after the N resupply, the second population of LDs in both ecotypes almost completely vanished at h24 and totally at h72, reaching a distribution similar to that of D0.

3.7 The distance between lipid droplets and the plastid indicates a movement of lipid droplets inside the cell upon nitrogen resupply

As degradation mechanisms may involve the movement of LDs inside the cell, the distances between LD and plastid were plotted as a function of LD volumes (Figure 10). The initial population of small LDs is located close ($\leq 5 \mu\text{m}$) to the plastid. Similarly, as the large LDs appear, they are also mostly found close to the plastid. In contrast, 24 hours after the N resupply, a vast number of small LDs are observed to be distant ($>5 \mu\text{m}$) from the plastid. At h72 the LD-plastid distance as a function of LD volume is similar to that of D0.

4 Discussion

In this study, we analyzed the formation and degradation dynamics of LDs in two genetically distant ecotypes of *P. tricornutum*, namely Pt1 and Pt4 (Rastogi et al., 2020). The evolution of intracellular organization, especially LD number and size appears to be variable between the two ecotypes. We also investigated the relationship between cell volume and the extent of LD accumulation. Finally, we provided insights into the so far elusive LD degradation pathways.

4.1 Ecotypes Pt1 and Pt4 comparison is a useful tool to observe differences in qualitatively similar strains

Several strains of *P. tricornutum* are able to drastically change their shape under conditions of varying temperature or salinity, shifting between the main triradiate, fusiform and oval

TABLE 1 Variation of individual mean LD volume for ecotypes Pt1 and Pt4 under N starvation and resupply.

Ecotype	Parameter	N replete		N starvation				N resupply	
		D0	D3	D7	D11	h24	h72		
Pt1	LD count (LD/cell)	3.57 ± 2.08	6.80 ± 2.78	6.20 ± 2.65	6.96 ± 3.06	12.10 ± 7.62	2.70 ± 2.71		
	V_Lipid ($\mu\text{m}^3/\text{cell}$)	0.32 ± 0.35	2.36 ± 1.95	3.12 ± 1.95	6.15 ± 3.52	4.15 ± 3.80	0.39 ± 0.83		
	V_Lipid/LD ($\mu\text{m}^3/\text{LD}$)	0.09 ± 0.04	0.35 ± 0.24	0.50 ± 0.35	0.88 ± 0.60	0.34 ± 0.25	0.14 ± 0.24		
Pt4	LD count (LD/cell)	2.65 ± 2.43	4.08 ± 1.25	4.59 ± 2.15	5.31 ± 2.62	10.39 ± 6.15	4.76 ± 1.57		
	V_Lipid ($\mu\text{m}^3/\text{cell}$)	0.56 ± 0.33	5.41 ± 3.28	5.39 ± 3.20	8.72 ± 5.42	2.03 ± 1.43	0.61 ± 0.32		
	V_Lipid/LD ($\mu\text{m}^3/\text{LD}$)	0.21 ± 0.10	1.32 ± 0.65	1.17 ± 0.57	1.64 ± 0.77	0.20 ± 0.16	0.13 ± 0.06		

Results are expressed as Mean ± Standard deviation (n = 24-37). Significance of the variation in LD count and V_lipid are reported in Figure 8, 4, respectively.

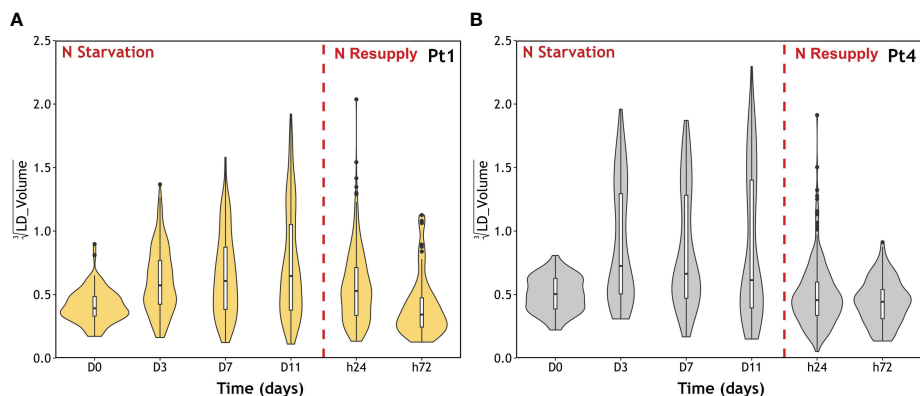


FIGURE 9

LD population volume distribution during the course of a nitrogen (N) starvation followed by a N resupply in Pt1 (A) and Pt4 (B) ecotypes. Plots are traced from the volumes collected in 100, 170, 155, 167, 389 and 79 LDs for Pt1 and 69, 96, 124, 138, 291 and 138 LDs for Pt4 at respective timepoints from D0 to h72. The violin plot outline represents the density of observations as a function of volume. Volumes are displayed as cubic roots to allow a better visualization. Box and whiskers plot: default parameters in R package ggplot2.

morphotypes (Ovide et al., 2018; Song et al., 2020; Galas et al., 2021). In the culture conditions used in this study, the major morphotype observed for both Pt1 and Pt4 is the fusiform one. As already described for fusiform cells (Flori et al., 2017; Brodrick et al., 2019), they both contain a unique plastid located at the center of the cell and displaying a bilobed shape (Figures 2, 3 and S1). Both strains also share the same major biochemical compounds including chlorophyll *a* and *c*, fucoxanthin as a major carotenoid, the β 1,3 glucan called chrysolaminarin as a storage carbohydrate and C16:0, C16:1 n-7 and C20:5 n-3 as major fatty acids in their total lipids fatty acid profiles (Abida et al., 2015; Popko et al., 2016; Huang et al., 2019; Scarsini et al., 2021).

Regarding their differences, a genome comparison highlighted that Pt4 was genetically diverging from all the 9 other investigated Pt ecotypes (Rastogi et al., 2020). We observed that the strains had similar growth rates in the tested conditions (Figure 1). However, by the time of the transition between N replete and N starvation phases, Pt1 cultures reached a higher cell density (7×10^6 cells/mL) than Pt4 cultures (5.3×10^6 cells/mL). In parallel, even including a high variability within the populations, we observed that the mean volume of Pt4 cells was 140% of that of Pt1 cells (D0, Figure 6). For a given nutrient quantity available in the medium, Pt4 cultures would hence reach a lower cell density than Pt1 cultures at the stationary phase as more nutrients are incorporated per cell. Such a pattern of cell density was observed in a previous comparison of Pt1 and Pt4 ecotypes (Scarsini et al., 2021). The same study also observed that Pt4 cultures had a higher N intake rate per cell, possibly due to an altered mode of nitrogen acquisition permitted by a higher number of copies of a nitrate assimilation gene (Phatr3_EG02286, nitrite reductase) as highlighted by Rastogi et al. (2020). In line with these results, lower cell densities were found in Pt4 compared to Pt1 but identical dry biomass accumulation was observed under N starvation, resulting in a higher content of dry mass per cell (Figure S3).

Considering cell dimensions, we observed that both cell length and width were higher in Pt4 cells as compared to Pt1 cells (Table

S1). The divergence could have arisen from an initial difference in the ecotypes. Indeed, the two ecotypes were initially isolated from different environments, namely, the ocean for Pt1 and brackish water in rock pools for Pt4 (Martino et al., 2007).

In addition, according to the photosynthetic characteristics observed through the PI curves obtained from both ecotypes it appeared that, even though the features (composition and size) of the light-harvesting antenna were similar as shown by the similar initial slope of the curves, the values of maximum photosynthesis and photoacclimation parameter showed that Pt1 reached photosynthesis saturation at a higher irradiance as compared to Pt4 (Supplementary Data S1). When light intensity was over the E_k value, Pt1 was not photoinhibited while Pt4 was, as demonstrated by the diminution of the electron transfer rate values. Therefore, the difference observed in photosynthetic characteristics further highlights the divergence between strains.

It is interesting to note that the length and the width of cells appear to be inconsistent between studies. For example, in the first global comparison of the 10 main ecotypes of *P. tricornutum*, de Martino et al. (2007) reported that Pt1 and Pt4 fusiform morphotypes do not differ in length (range 19–24 μm) and that Pt1 cells had a higher width (2.9–3.9 μm) than Pt4 cells (2.5–3.6 μm). By contrast, a more recent report showed that Pt4 cells had the same length, but a higher width than Pt1 ones, resulting in a higher volume (Scarsini et al., 2021). These differences could have arisen from phenotypic plasticity as a result of an acclimation to each laboratory culture conditions such as culture medium, photoperiod, light irradiance or temperature.

The drifting of strains maintained in different laboratories along replications on the long term could also be a variation factor. A varying acclimation and, hypothetically, the accumulation of mutations would lead to strains with different physiological characteristics. Indeed, we also traced photosynthesis-irradiance curves of two different strains of Pt1, our Pt1 and another Pt1 strain (Pt1_Wuhan). As can be seen in Supplementary Data S1, Pt1_Wuhan displays intermediate characteristics between those of

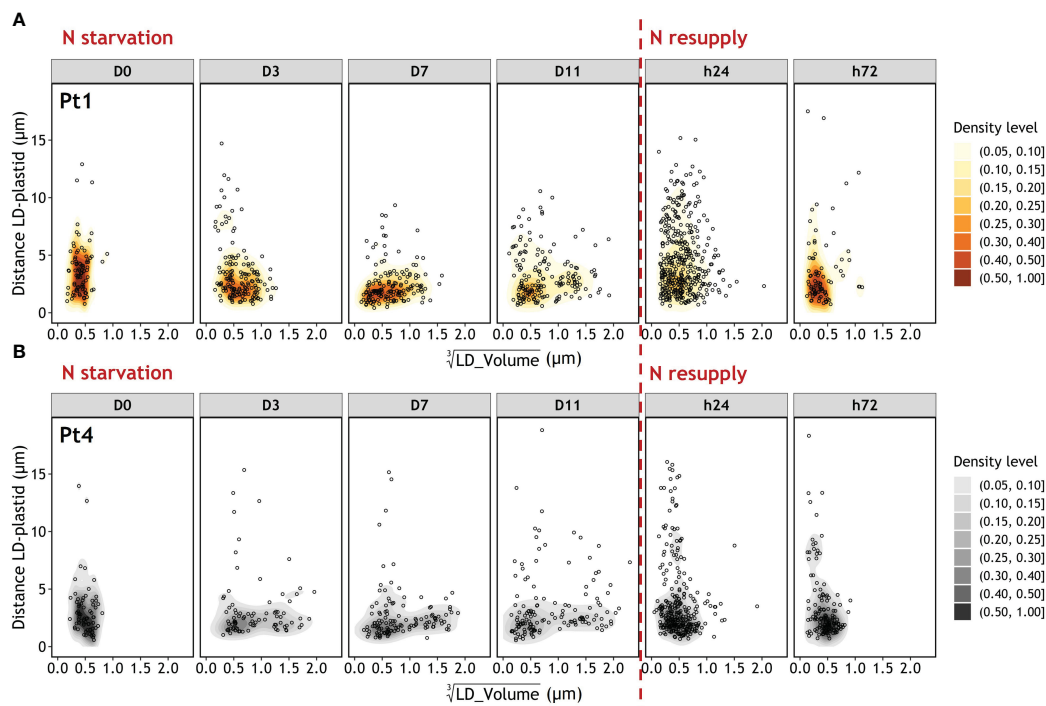


FIGURE 10

Evolution of the Euclidian distance between LD and plastid as a function of LD volume during a nitrogen (N) starvation followed by a N resupply in Pt1 (A) and Pt4 (B) ecotypes. Density levels represent the probability of finding a data point within the corresponding area. Maps are traced from the volumes and coordinates collected in 100, 170, 155, 167, 389 and 79 LDs for Pt1 and 69, 96, 124, 138, 291 and 138 LDs for Pt4 at respective timepoints from D0 to h72. Volumes are displayed as cubic roots to allow a better visualization.

Pt4 and those of Pt1. It was also previously shown that these two Pt1 strains diverged in their lipid accumulation strategy (Scarsini et al., 2021).

Finally, another possible variation factor for cell dimensions is the measurement technique employed. Using a high-resolution electron microscopy approach associated to 3D reconstruction, a recent study reported a volume for Pt1 cells of $32.6 \pm 2.4 \mu\text{m}^3$ which correspond to the lower end of our observations (Figure 6) (Uwizeye et al., 2021). Whether such a “low” value is due to sampling bias, to different culture conditions, to the precision of the method or to inherent characteristics of this clone of Pt1 remains to be determined. Nonetheless, in our study, the sampling bias was reduced by using an automated approach to measure all the cells present in our bright field microscopy images.

4.2 How does cell volume influence the lipid accumulation dynamics under nitrogen starvation?

Exposing microalgae to N starvation is a common way for inducing neutral lipid accumulation and storage in LDs. In this condition, either ecotype reacted similarly by decreasing their thylakoids volume in parallel to increasing their total LD volume (Figure 4). The thylakoid and LD volumes can be considered as an estimator of total chlorophyll (Broddrick et al., 2019) and neutral lipid (Jaussaud et al., 2020) contents, respectively. N starved cells

shift their metabolism from an active to a stand-by mode to wait for more favorable conditions. In the transition phase between N replete and N starved conditions, cells increase their N assimilation capacity and in the meantime recycle N containing molecules including chlorophylls (Scarsini et al., 2022). The decrease in chlorophyll content, also permits the reduction of their photosynthetic machinery to a minimal point, to prevent the accumulation of reactive oxygen species. In parallel, cells reorient their carbon central metabolism towards the production of neutral lipids, in part to store electrons produced by the residual photosynthesis and in part by recycling the fatty acid of plastidial membrane lipids produced during the dismantling of thylakoid membranes (Abida et al., 2015; Remmers et al., 2017; Huang et al., 2019; Scarsini et al., 2022).

The onset of cell response to N starvation is also observed by an arrest of growth after one doubling of cell density between D0 and D3 (Figure 1). This division is permitted by the use of intracellular N storage (Shoman, 2015). During the N starvation phase, cell volumes were shown to decrease in both ecotypes (Figure 6). A possible hypothesis for this decrease would be that cell size is related to cell division. Under a division regime, mother cells would enlarge before dividing into two daughters. This would be coherent with the fact that both Pt1 and Pt4 volume variations were well-correlated with width variations (Figures S2) as, during division, *P. tricornutum* daughter cells are formed side by side, separating along a longitudinal dividing plane (Tanaka et al., 2015). However, as Pt1 volume is also correlated to its length (Figure

S2A), this explanation is not sufficient at least for this ecotype. The reduction in cell volume under nitrogen stress is in line with what was observed in Pt4 in a previous study (Huang et al., 2019), but the same study showed that an increase in cell volume was observed under phosphorus limitation, even though this condition also limits growth. Additionally, other types of environmental change were shown to influence both cell size and growth rate of diatoms. Some conditions produced similar effects to nitrogen deficiency. A reduction in irradiance induced a reduction in cell size and growth rate in *P. tricornutum* and 6 other diatoms (Thompson et al., 1991) and an iron deficiency reduced cell volume and growth rates in *Pseudo-nitzschia* spp. (Marchetti and Harrison, 2007). Others had phosphorus limitation-like effects such as an increase in temperature that induced an increase in cell size but a decrease in growth rate in *Thalassiosira pseudonana* (Sheehan et al., 2020), or a decrease in salinity that provoked the same effects in *Corethron hystrix* (Aizdaicher and Markina, 2010). The multiple factors that influence cell volume and their relative contribution should hence be determined, as this parameter directly influence available intracellular space for the plastid but also for LD accumulation.

Indeed, previous experiments highlighted that cell volume of *P. tricornutum* could be a limiting factor of neutral lipid accumulation by limiting the size of the largest LDs (Jaussaud et al., 2020): as the large LDs reach a maximal volume determined by cytosolic space left available after considering the volumes of plastid, mitochondria and nucleus, further lipid accumulation occurs through smaller LDs that occupy the remaining gaps (Jaussaud et al., 2020). However, this report did not consider neither the variation in the relative size of cellular organelles, the relative size of the vacuole, nor the variations in cell volume. More recently, a 3D reconstruction showed that under replete conditions, around 45% of total cytosolic volume is occupied by the plastid, nucleus and mitochondrion leaving at most 55% for LDs (Uwizeye et al., 2021). Under N starvation, we observed that the reduction in chlorophyll content is highly correlated to a reduction in the volume of thylakoids (Figure 5). This reduction in thylakoid volume could be concomitant with a reduction in global plastid volume, as this organelle was previously shown to shrink under N starvation in the diatom *Cyclotella meneghiniana* (Rosen and Lowe, 1984). Our data showed that the reduction in thylakoid volume had a higher amplitude than that of the increase in total LD volume: between D0 and D11, the thylakoid volume loss is of 9.8 and 14.8 μm^3 , while the LD volume gain is of 5.8 and 8.2 μm^3 for Pt1 and Pt4, respectively (Figure 4).

Although the reduction in volume of cells from both ecotypes under N starvation must also be considered (mean reduction of 41 μm^3 for Pt1 and 20 μm^3 for Pt4; Figure 6), the proportion of total cell volume occupied by LDs remains low, going from 0.16 and 0.20% at D0 to 3.9 and 3.4% at D11 for Pt1 and Pt4, respectively (calculated from Figures 4, 6).

To summarize, Pt4 cells were larger than those of Pt1 and they also had a higher thylakoid volume at D0 as well as a higher LD volume at D11. In addition to a limitation by available intracellular space, we hence suggest a new hypothesis for explaining a higher lipid accumulation in large cells: these cells have a more voluminous plastid that could provide more thylakoid membrane lipids to be

recycled into LDs during N starvation. This hypothesis could be tested by comparing a wider range of ecotypes with varying thylakoid under N replete conditions volume and their respective total LD volume accumulation.

The two hypotheses are not mutually exclusive as the neutral lipids that are stored in LDs are likely synthesized from both recycling of preexisting lipids and *de novo* synthesis. Indeed, some reports highlighted a major role in lipid recycling (Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022) as genes related to lipid synthesis are mostly downregulated under N limited/starved conditions and genes related to lipid recycling are upregulated. Other studies show that the extent of lipid accumulation must include *de novo* synthesis as a major mechanism as the reduction in polar lipids observed under N starvation is not high enough to account for the increase in neutral lipids (Abida et al., 2015; Haslam et al., 2020). However the source of carbon for *de novo* synthesis must be already present in the cell, for example the backbone of recycled amino acids or storage carbohydrates, as carbon fixation by photosynthesis is almost abolished under N starvation, as shown by a near-stability of C intracellular quota (Scarsini et al., 2022) and a decrease in photosynthetic parameters along with the downregulation at both transcript and protein levels of most of the genes involved in photosynthesis (Longworth et al., 2016; Remmers et al., 2018; Scarsini et al., 2022). Therefore, in depth biochemical investigation should be conducted to determine the respective importance of the two (or more) limiting factors to the extent of LD accumulation.

4.3 The distinct lipid droplet accumulation strategies of ecotypes Pt1 and Pt4

The CLSM data presented in this contribution highlight similarities and differences between the strategies of LD formation in the two ecotypes, Pt1 and Pt4. Both strains had a basal population of small LDs at D0 (Figure 9). Upon N starvation, the cells from both strains produced additional LDs, but with two different strategies highlighted by the repartition of lipids between LDs (Figure 7 and Table 1) and the distribution of LD volumes (Figure 9). Until now, it was described that Pt1 cells accumulated multiple small LDs that appear by waves and stop increasing in volume after 3 to 4 days, while Pt4 cells produced only 2 large ones which volume increased during the N starvation (Wong and Franz, 2013; Jaussaud et al., 2020; Leyland et al., 2020b). Our high-resolution approach coupled to 3D modelling confirmed and refined these observations. We described that Pt4 concentrates its lipids in two large LDs accounting for 90% of total LD volume (Figure 7), creating an additional LD subpopulation to the basal population containing the remaining 10%. Considering LD distribution, the observations on Pt1 are also in line with previous work with the presence of a higher number of smaller LDs (Jaussaud et al., 2020). The progressive growth of the population of large LDs in both strains from D3 to D11 of N starvation (Figure 9) is coherent with Pt4 previous observations (Wong and Franz, 2013; Leyland et al., 2020b) but not with those in Pt1 (Jaussaud et al., 2020). Such a discrepancy for Pt1 could have

arisen from a variation in culture conditions and/or strain variations between laboratories. Overall, the main difference between Pt1 and Pt4 lipid accumulation strategies resides in how the population of larger LDs behaves.

4.4 After nitrogen resupply, both ecotypes consume their lipid droplets using a similar fragmentation mechanism

While N starvation induced a stand-by state in Pt1 and Pt4 cells, N resupply triggered a fast recovery in both ecotypes, with a decrease in LD volume in parallel of an increase in thylakoid volume (and total chlorophyll content) and with growth resuming between time points h24 and h72 after N resupply (Figure 1, 4, 5A). This behavior is in line with what was observed in the few resupply experiments previously conducted on *P. tricornutum* Pt1 and Pt4 (Valenzuela et al., 2013; Jallet et al., 2020; Scarsini et al., 2022; Taparia et al., 2022), where N resupply induced an immediate increase in pigments, and a simultaneous (Pt1, Jallet et al., 2020; Pt4, Scarsini et al., 2022) or delayed to 48h (Pt1; Valenzuela et al., 2013) decrease in neutral lipids. In all experiments, growth resumed within around 48 hours as we also observed.

In all resupply experiments, cell division follows the consumption of neutral lipids. However, the mechanisms underlying this phenomenon are still elusive. The fragmentation of LDs that we proposed to explain the results observed 24 hours after N resupply (Table 1) has not been described previously in microalgae or diatoms. Actually, the nutrient resupply experiments conducted on the diatom *Fistulifera solaris* JPC DA0580 showed a rather different behavior, with the two large LDs of this species progressively shrinking without signs of fragmentation (Nomaguchi et al., 2018; Nonoyama et al., 2019). To our knowledge, such a fragmentation phenotype of large LDs under lipid consuming conditions has only been described in murine 3T3-L1 adipocytes (Paar et al., 2012; Chitraju et al., 2017). In *P. tricornutum*, fragmentation could be a way to enhance the surface to volume ratio and obtain a more efficient access of lipases to the neutral lipids contained in LDs.

Consumption of lipids could occur by lipolysis (direct consumption of lipids at the surface of LDs), lipophagy (autophagy-based bulk consumption in vacuoles), or a combination of both. As an evidence of lipolysis, it was previously shown that the inactivation of non-vacuolar lipases in *P. tricornutum* led to an accumulation of neutral lipids (Barka et al., 2016; Li et al., 2018). Recently, evidence towards the importance of lipophagy have also been obtained. One major LD protein of *P. tricornutum*, the Stramenopile lipid droplet protein (StLDP), contains a domain of interaction with ATG8, a crucial protein for autophagy (Leyland et al., 2020a). Indeed, in *Nannochloropsis oceanica*, another Stramenopile microalga model, the major lipid droplet protein (NoLDSP) was shown to interact with ATG8 under lipid consumption conditions. The authors also observed patterns of lipophagy using transmission electron microscopy describing the engulfment of LDs in vacuoles (Zienkiewicz et al., 2020). As a further clue for the role of StLDP in lipophagy, two recent studies

reported that mutant lines of *P. tricornutum* Pt1 (Taparia et al., 2022) and Pt4 (Yoneda et al., 2023) whose StLDP gene was knock-out by CRISPR-Cas9 showed an impaired LD degradation upon nutrient resupply. Our data highlighted that a high number of LDs were located far from the plastid at timepoint h24 (Figure 10). This movement of LDs away from the plastid could indicate an association with the vacuoles, as in *P. tricornutum* fusiform cells vacuoles expand towards the arms (Liu et al., 2016; Schreiber et al., 2017), and could suggest lipophagy. However, LDs could also associate to peroxisomes or the mitochondria as a way to direct the fatty acids produced by lipolysis to the β -oxidation pathway, although in *P. tricornutum* the mitochondria is tightly associated with the plastid (Flori et al., 2017; Uwizeye et al., 2021). Indeed, lipolysis and lipophagy are not mutually exclusive and signs of both of them should be further investigated through electron microscopy. Finally, an inhibitor assay conducted in the diatoms *F. solaris* and *P. tricornutum* Pt1 (Nonoyama et al., 2019) showed that the extent of lipid consumption was reduced but not suppressed after nutrient resupply when autophagy was inhibited, which is a further proof that lipolysis and lipophagy act in combination.

5 Conclusions

In this work, a combination of microscopic methods were used to follow and compare cells from ecotypes Pt1 and Pt4 experiencing a N starvation and resupply conditions. Nitrogen starvation produced a standby mode where an accumulation of LDs occurs at the expense of the plastid. In this context, the two ecotypes adopted distinct strategies regarding the repartition of accumulated lipids between LDs. Additionally, the extent of lipid accumulation was possibly linked to cell volume as larger cells contain a larger plastid to be disassembled as a source for neutral lipid production. Finally, when resupplied with nitrogen, fast recovery was achieved in both ecotypes through a similar fragmentation process that could be linked to lipophagy. Our findings lead to several further questions: (1) what are the underlying determinants of the maximal size of LDs in both ecotypes? (2) which molecular mechanism governs the fragmentation of LDs? (3) what is the respective importance of lipolysis and lipophagy in LD degradation? Future investigation shall tackle these aspects by comparing the response of the ecotypes to a silencing of specific LD proteins or proteins involved in lipid degradation.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Author contributions

VM: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing- original draft,

Writing- review & editing. JH: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Supervision, Validation, Visualization, Writing- review & editing. MC: Investigation, Methodology, Writing- review & editing. SG: Investigation, Writing- review & editing. AL: Conceptualization, Data curation, Methodology, Software, Writing- review & editing. CC: Conceptualization, Data curation, Methodology, Software, Writing- review & editing. MBe: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing- review & editing. LG: Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Writing- review & editing. BS: Methodology, Validation, Writing- review & editing. JM: Conceptualization, Data curation, Methodology, Supervision, Validation, Visualization, Writing- review & editing. MBa: Conceptualization, Supervision, Validation, Writing- review & editing. LU: Conceptualization, Data curation, Supervision, Validation, Visualization, Writing- review & editing.

Funding

The authors declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. VM was a recipient of a PhD fellowship from the Collectivités Locales Mayennaises.

Acknowledgments

The authors would like to thank Carole Burel from the GlycoMEV UR4358 lab and Damien Schapman from HeRacLeS-

PRIMACEN, University of Rouen Normandie for technical help. The authors are also grateful to Pr H. Hu (Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan China) for kindly providing the Pt1_Wuhan strain.

Conflict of interest

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

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1257500/full#supplementary-material>

References

- Abida, H., Dolch, L.-J., Mei, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M. A., et al. (2015). Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* 167, 118–136. doi: 10.1104/pp.114.252395
- Azdaicher, N. A., and Markina, Z. V. (2010). The effect of decrease in salinity on the dynamics of abundance and the cell size of *Corethron hystrix* (Bacillariophyta) in laboratory culture. *Ocean Sci. J.* 45, 1–5. doi: 10.1007/s12601-010-0001-8
- Alipanah, L., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A. M., and Brembu, T. (2015). Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *EXBOTJ* 66, 6281–6296. doi: 10.1093/jxb/erv340
- Alipanah, L., Winge, P., Rohloff, J., Najafi, J., Brembu, T., and Bones, A. M. (2018). Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One* 13, e0193335. doi: 10.1371/journal.pone.0193335
- Allen, A. E., Dupont, C. L., Obornik, M., Horák, A., Nunes-Nesi, A., McCrow, J. P., et al. (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature* 473, 203–207. doi: 10.1038/nature10074
- Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W., Schindelin, J., Cardona, A., et al. (2017). Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics* 33, 2424–2426. doi: 10.1093/bioinformatics/btx180
- Barka, F., Angstenberger, M., Ahrendt, T., Lorenzen, W., Bode, H. B., and Büchel, C. (2016). Identification of a triacylglycerol lipase in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Cell Biol. Lipids* 1861, 239–248. doi: 10.1016/j.bbalip.2015.12.023
- Benoiston, A.-S., Ibarbalz, F. M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S., et al. (2017). The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Phil. Trans. R. Soc B* 372, 20160397. doi: 10.1098/rstb.2016.0397
- Broddrick, J. T., Du, N., Smith, S. R., Tsuiji, Y., Jallet, D., Ware, M. A., et al. (2019). Cross-compartment metabolic coupling enables flexible photoprotective mechanisms in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol.* 222, 1364–1379. doi: 10.1111/nph.15685
- Burch, A. R., and Franz, A. K. (2016). Combined nitrogen limitation and hydrogen peroxide treatment enhances neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresour. Technol.* 219, 559–565. doi: 10.1016/j.biortech.2016.08.010
- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., and Simpson, A. G. B. (2020). The new tree of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* 35, 43–55. doi: 10.1016/j.tree.2019.08.008
- Butler, T., Kapoor, R. V., and Vaidyanathan, S. (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: a diatom cell factory. *Trends Biotechnol.* 38, 606–622. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.12.023
- Chitraju, C., Mejhert, N., Haas, J. T., Diaz-Ramirez, L. G., Grueter, C. A., Imbriglio, J. E., et al. (2017). Triglyceride synthesis by DGAT1 protects adipocytes from lipid-induced ER stress during lipolysis. *Cell Metab.* 26, 407–418.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2017.07.012
- Dolch, L.-J., Lupette, J., Tourcier, G., Bedhomme, M., Collin, S., Magneschi, L., et al. (2017). Nitric oxide mediates nitrite-sensing and acclimation and triggers a remodeling of lipids. *Plant Physiol.* 175, 1407–1423. doi: 10.1104/pp.17.01042
- Duarte, B., Feijão, E., Goessling, J. W., Caçador, I., and Matos, A. R. (2021). Pigment and fatty acid production under different light qualities in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Sci.* 11, 2550. doi: 10.3390/app11062550
- Flori, S., Jouneau, P.-H., Baillet, B., Gallet, B., Estrozi, L. F., Moriscot, C., et al. (2017). Plastid thylakoid architecture optimizes photosynthesis in diatoms. *Nat. Commun.* 8, 15885. doi: 10.1038/ncomms15885
- Flori, S., Jouneau, P.-H., Finazzi, G., Maréchal, E., and Falconet, D. (2016). Ultrastructure of the periplastidial compartment of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist* 167, 254–267. doi: 10.1016/j.protis.2016.04.001
- Galas, L., Burel, C., Schapman, D., Ropitiaux, M., Bernard, S., Bénard, M., et al. (2021). Comparative structural and functional analyses of the fusiform, oval, and

- triradiate morphotypes of *Phaeodactylum tricornutum* Pt3 strain. *Front. Plant Sci.* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.638181
- Grosche, C., Hempel, F., Bolte, K., Zauner, S., and Maier, U. G. (2014). The periplastidal compartment: a naturally minimized eukaryotic cytoplasm. *Curr. Opin. Microbiol.* 22, 88–93. doi: 10.1016/j.mib.2014.09.017
- Guillard, R. R. L., and Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239. doi: 10.1139/m62-029
- Haslam, R. P., Hamilton, M. L., Economou, C. K., Smith, R., Hassall, K. L., Napier, J. A., et al. (2020). Overexpression of an endogenous type 2 diacylglycerol acyltransferase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* enhances lipid production and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content. *Biotechnol. Biofuels* 13, 87. doi: 10.1186/s13068-020-01726-8
- Heydarizadeh, P., Veidl, B., Huang, B., Lukomska, E., Wielgosz-Collin, G., Couzinet-Mossion, A., et al. (2019). Carbon orientation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: the effects of carbon limitation and photon flux density. *Front. Plant Sci.* 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00471
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., and Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35, 403–424. doi: 10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x
- Huang, B., Marchand, J., Blanckaert, V., Lukomska, E., Ulmann, L., Wielgosz-Collin, G., et al. (2019). Nitrogen and phosphorus limitations induce carbon partitioning and membrane lipid remodeling in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Eur. J. Phycol.* 54, 342–358. doi: 10.1080/09670262.2019.1567823
- Jallet, D., Xing, D., Hughes, A., Moosburner, M., Simmons, M. P., Allen, A. E., et al. (2020). Mitochondrial fatty acid β -oxidation is required for storage-lipid catabolism in a marine diatom. *New Phytol.* 228, 946–958. doi: 10.1111/nph.16744
- Jaussaud, A., Lupette, J., Salvaing, J., Jouhet, J., Bastien, O., Gromova, M., et al. (2020). Stepwise biogenesis of subpopulations of lipid droplets in nitrogen starved *Phaeodactylum tricornutum* cells. *Front. Plant Sci.* 11. doi: 10.3389/fpls.2020.00048
- Jeffrey, S. W., and Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen* 167, 191–194. doi: 10.1016/S0015-3796(17)30778-3
- Kong, F., Romero, I. T., Warakanont, J., and Li-Beisson, Y. (2018). Lipid catabolism in microalgae. *New Phytol.* 218, 1340–1348. doi: 10.1111/nph.15047
- Levering, J., Brodrick, J., Dupont, C. L., Peers, G., Beeri, K., Mayers, J., et al. (2016). Genome-scale model reveals metabolic basis of biomass partitioning in a model diatom. *PLoS One* 11, e0155038. doi: 10.1371/journal.pone.0155038
- Leyland, B., Boussiba, S., and Khozin-Goldberg, I. (2020a). A review of diatom lipid droplets. *Biology* 9, 38. doi: 10.3390/biology9020038
- Leyland, B., Zarka, A., Didi-Cohen, S., Boussiba, S., and Khozin-Goldberg, I. (2020b). High resolution proteome of lipid droplets isolated from the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* (*Bacillariophyceae*) strain pt4 provides mechanistic insights into complex intracellular coordination during nitrogen deprivation. *J. Phycol.* 56, 1642–1663. doi: 10.1111/jpy.13063
- Li, X., Pan, Y., and Hu, H. (2018). Identification of the triacylglycerol lipase in the chloroplast envelope of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 33, 440–447. doi: 10.1016/j.algal.2018.06.023
- Liu, X., Hempel, F., Stork, S., Bolte, K., Moog, D., Heimerl, T., et al. (2016). Addressing various compartments of the diatom model organism *Phaeodactylum tricornutum* via sub-cellular marker proteins. *Algal Res.* 20, 249–257. doi: 10.1016/j.algal.2016.10.018
- Longworth, J., Wu, D., Huete-Ortega, M., Wright, P. C., and Vaidyanathan, S. (2016). Proteome response of *Phaeodactylum tricornutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion. *Algal Res.* 18, 213–224. doi: 10.1016/j.algal.2016.06.015
- Marchetti, A., and Harrison, P. J. (2007). Coupled changes in the cell morphology and the elemental (C, N, and Si) composition of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia* due to iron deficiency. *Limnology Oceanography* 52, 2270–2284. doi: 10.4319/lo.2007.52.5.2270
- Mourya, M., Mohd, J., Ahirwar, A., Schoefs, B., Marchand, J., Rai, A., et al. (2022). Latest trends and developments in microalgae as potential source for biofuels: The case of diatoms. *Fuel* 314, 122738. doi: 10.1016/j.fuel.2021.122738
- Murison, V., Héroult, J., Schoefs, B., Marchand, J., and Ulmann, L. (2023). Bioinformatics-based screening approach for the identification and characterization of lipolytic enzymes from the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs* 21, 125. doi: 10.3390/md21020125
- Nomaguchi, T., Maeda, Y., Liang, Y., Yoshino, T., Asahi, T., and Tanaka, T. (2018). Comprehensive analysis of triacylglycerol lipases in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 with transcriptomics under lipid degradation. *J. Bioscience Bioengineering* 126, 258–265. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.03.003
- Nonoyama, T., Nojima, D., Maeda, Y., Noda, M., Yoshino, T., Matsumoto, M., et al. (2019). Proteomics analysis of lipid droplets indicates involvement of membrane trafficking proteins in lipid droplet breakdown in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris*. *Algal Res.* 44, 101660. doi: 10.1016/j.algal.2019.101660
- Ovide, C., Kiefer-Meyer, M.-C., Bérard, C., Vergne, N., Lacroq, T., Plasson, C., et al. (2018). Comparative in depth RNA sequencing of *P. tricornutum*'s morphotypes reveals specific features of the oval morphotype. *Sci. Rep.* 8, 14340. doi: 10.1038/s41598-018-32519-7
- Paar, M., Jüngst, C., Steiner, N. A., Magnes, C., Sinner, F., Kolb, D., et al. (2012). Remodeling of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 11164–11173. doi: 10.1074/jbc.M111.316794
- Popko, J., Herrfurth, C., Feussner, K., Ischebeck, T., Iven, T., Haslam, R., et al. (2016). Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One* 11, e0164673. doi: 10.1371/journal.pone.0164673
- Rastogi, A., Vieira, F. R. J., Deton-Cabanillas, A.-F., Veluchamy, A., Cantrel, C., Wang, G., et al. (2020). A genomics approach reveals the global genetic polymorphism, structure, and functional diversity of ten accessions of the marine model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *ISME J.* 14, 347–363. doi: 10.1038/s41396-019-0528-3
- Remmers, I. M., D'Adamo, S., Martens, D. E., De Vos, R. C. H., Mumm, R., America, A. H. P., et al. (2018). Orchestration of transcriptome, proteome and metabolome in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during nitrogen limitation. *Algal Res.* 35, 33–49. doi: 10.1016/j.algal.2018.08.012
- Remmers, I. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., and Lamers, P. P. (2017). Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen starvation at different light intensities. *PLoS One* 12, e0175630. doi: 10.1371/journal.pone.0175630
- Rosen, B. H., and Lowe, R. L. (1984). Physiological and ultrastructural responses of *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyta) to light intensity and nutrient limitation. *J. Phycol.* 20, 173–183. doi: 10.1111/j.0022-3646.1984.00173.x
- Sayanova, O., Mimouni, V., Ulmann, L., Morant, A., Pasquet, V., Schoefs, B., et al. (2017). Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 372, 20160407. doi: 10.1098/rstb.2016.0407
- Scarsini, M., Thiriet-Rupert, S., Veidl, B., Mondeguer, F., Hu, H., Marchand, J., et al. (2022). The transition toward nitrogen deprivation in diatoms requires chloroplast stand-by and deep metabolic reshuffling. *Front. Plant Sci.* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.760516
- Scarsini, M., Thurotte, A., Veidl, B., Amiard, F., Niepceron, F., Badawi, M., et al. (2021). Metabolite quantification by Fourier transform infrared spectroscopy in diatoms: proof of concept on *Phaeodactylum tricornutum*. *Front. Plant Sci.* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.756421
- Schreiber, V., Dersch, J., Puzik, K., Bäcker, O., Liu, X., Stork, S., et al. (2017). The central vacuole of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: identification of new vacuolar membrane proteins and of a functional di-leucine-based targeting motif. *Protist* 168, 271–282. doi: 10.1016/j.protis.2017.03.001
- Sharma, N., Fleurent, G., Awwad, F., Cheng, M., Meddeb-Mouelhi, F., Budge, S. M., et al. (2020). Red light variation an effective alternative to regulate biomass and lipid profiles in *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Sci.* 10, 2531. doi: 10.3390/app10072531
- Sheehan, C. E., Baker, K. G., Nielsen, D. A., and Petrou, K. (2020). Temperatures above thermal optimum reduce cell growth and silica production while increasing cell volume and protein content in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Hydrobiologia* 847, 4233–4248. doi: 10.1007/s10750-020-04408-6
- Shoman, N. (2015). The dynamics of the intracellular contents of carbon, nitrogen, and chlorophyll a under conditions of batch growth of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bohli) at different light intensities. *Russ. J. Mar. Biol.* 41, 356–362. doi: 10.1134/S1063074015050132
- Shu, Q., Pan, Y., and Hu, H. (2023). CGI-58 protein acts as a positive regulator of triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 1–9. doi: 10.4014/jmb.2209.09029
- Song, Z., Lye, G. J., and Parker, B. M. (2020). Morphological and biochemical changes in *Phaeodactylum tricornutum* triggered by culture media: Implications for industrial exploitation. *Algal Res.* 47, 101822. doi: 10.1016/j.algal.2020.101822
- Tanaka, A., De Martino, A., Amato, A., Montsant, A., Mathieu, B., Rostaing, P., et al. (2015). Ultrastructure and membrane traffic during cell division in the marine pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist* 166, 506–521. doi: 10.1016/j.protis.2015.07.005
- Taparia, Y., Dolui, A. K., Boussiba, S., and Khozin-Goldberg, I. (2022). Multiplexed genome editing via an RNA polymerase II promoter-driven sgRNA array in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: insights into the role of StLDP. *Front. Plant Sci.* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.784780
- Thompson, P. A., Harrison, P. J., and Parslow, J. S. (1991). Influence of irradiance on cell volume and carbon quota for ten species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 27, 351–360. doi: 10.1111/j.0022-3646.1991.00351.x
- Trentacoste, E. M., Shrestha, R. P., Smith, S. R., Gle, C., Hartmann, A. C., Hildebrand, M., et al. (2013). Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 19748–19753. doi: 10.1073/pnas.1309299110
- Uwizeye, C., Decelle, J., Jouneau, P.-H., Flori, S., Gallet, B., Keck, J.-B., et al. (2021). Morphological bases of phytoplankton energy management and physiological responses unveiled by 3D subcellular imaging. *Nat. Commun.* 12, 121049. doi: 10.1038/s41467-021-21314-0
- Valenzuela, J., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K., Peyton, B. M., Bothner, B., et al. (2013). Nutrient resupplementation arrests bio-oil accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7049–7059. doi: 10.1007/s00253-013-5010-y
- Wong, D. M., and Franz, A. K. (2013). A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy. *J. Microbiological Methods* 95, 122–128. doi: 10.1016/j.mimet.2013.07.026

Yoneda, K., Oishi, R., Yoshida, M., Matsuda, Y., and Suzuki, I. (2023). Stramenopile-type lipid droplet protein functions as a lipid droplet scaffold protein in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant And Cell Physiol.* 64, 803–813. doi: 10.1093/pcp/pcad040

Zienkiewicz, K., and Zienkiewicz, A. (2020). Degradation of lipid droplets in plants and algae—right time, many paths, one goal. *Front. Plant Sci.* 11. doi: 10.3389/fpls.2020.579019

Zienkiewicz, A., Zienkiewicz, K., Poliner, E., Pulman, J. A., Du, Z.-Y., Stefano, G., et al. (2020). The microalga *Nannochloropsis* during transition from quiescence to autotrophy in response to nitrogen availability. *Plant Physiol.* 182, 819–839. doi: 10.1104/pp.19.00854

Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., and Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Prog. Lipid Res.* 70, 1–16. doi: 10.1016/j.plipres.2018.03.001

1.3 – Matériel supplémentaire



Comparison of two *Phaeodactylum tricornutum* Ecotypes under Nitrogen Starvation and Resupply Reveals Distinct Lipid Accumulation Strategies but a Common Degradation Process

Victor Murison et al.

Supplementary Material

Supplementary Data S1

Supplementary Figures S1-S3

Supplementary Table S1

Supplementary Data S1

To determine how the different strains of *P. tricornutum* react to increasing light intensities, rapid light curves (PI curves) during which diatoms are quickly exposed to a range of light levels while relative electron transport rate (rETR) is estimated from the fluorescence intensity (White and Critchley, 1999). The measurement were performed using Dual-PAM 100, (Walz, Germany) using the default routine. Figure SD1 presents the rapid light curves obtained with the different strains of *P. tricornutum* tested: the Pt1 and Pt4 ecotypes used in this study, and an additional Pt1 strain, Pt1_Wuhan kindly provided by Pr H. Hu (Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan China).

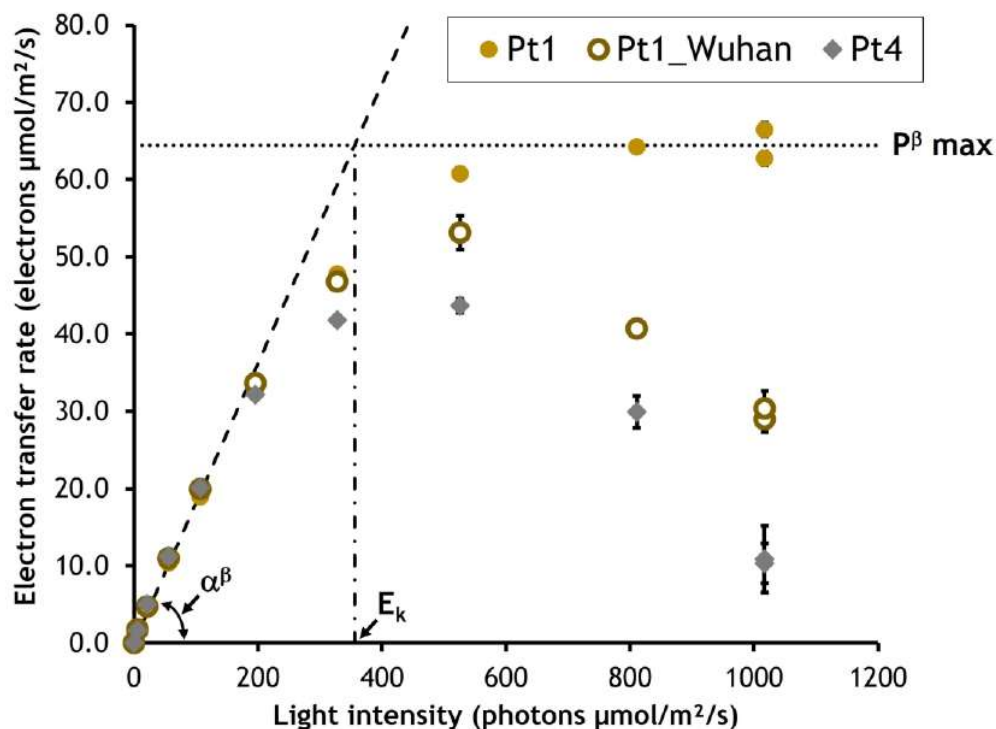


Figure SD1: Photosynthesis irradiance (PI) curves of the three strains Pt1, Pt1_Wuhan and Pt4.

Relative electron transfer rate was used as a proxy for photosynthetic rate and traced as a function of light intensity. The photophysiological parameters are displayed on the graph: $\alpha\beta$ is the initial slope, $P^{\beta\text{max}}$ the maximum photosynthetic rate (approximated by the electron transfer rate) and E_k the light saturation parameter that indicates the onset of saturation. Mean of three biological replicates are presented.

Individual PI-curves were fitted according to the model proposed by (Eilers and Peeters, 1988). From these data, the following parameters were calculated:

- α_β parameter is defined as the initial slope of the rapid light curve. This parameter is usually considered as proportional to the efficiency in which microalgae harvest light (Eilers and Peeters, 1988; Nguyen-Deroche et al., 2012).
- P_{Max}^β parameter is defined as the asymptotic value of light-curve. It reflects the maximal rETR (Eilers and Peeters, 1988; Nguyen-Deroche et al., 2012).
- E_k parameter is defined as the irradiance corresponding to the intercept between α_β and P_{Max}^β . E_k is considered as an index for photosynthetic light saturation. Photon flux densities above the E_k value can cause photooxidative stress resulting in an increase of photoinhibition (Horton and Ruban, 1992; Barber, 1995; Niyogi, 1999).

Table SD1: Photophysiological parameters derived from the photosynthesis irradiance curves of the three strains Pt1, Pt1_Wuhan and Pt4.

Strain	P^β max ($\mu\text{mol electrons}/\text{m}^2/\text{s}$)	α^β ($\mu\text{mol electrons}/\mu\text{mol photons}$)	E_k ($\mu\text{mol photons}/\text{m}^2$)
Pt1	64.4	0.1809	356
Pt1 Wuhan	53.2	0.1896	281
Pt4	43.7	0.1924	227

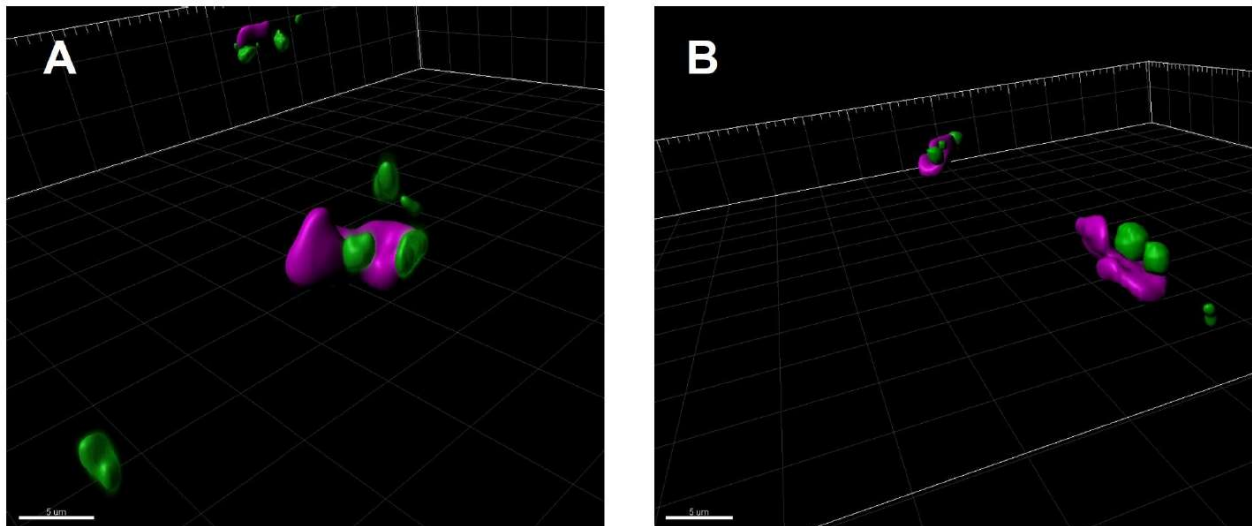
The values of α_β of the different strains were very close (Table SD1), indicating that the composition and the size of the light-harvesting antenna complexes were not different among the strains because they were all growing at the same growth light intensity. In contrast, they differed in the values of P_{Max}^β and therefore in E_k (Table SD1). According to the measurements, the strain performing best photosynthesis at the optimum light intensity was Pt1 followed by Pt1-Wuhan, and Pt4. In these growth conditions, $E_{k,Pt4}$ was evaluated to be 227 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Table SD1), a value intermediates between those found for this ecotype grown at 30 or 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Heydarizadeh et al., 2017). When the light intensity was over the E_k values, only Pt1 was not photoinhibited and the two other strains failed to maintain the electron transfer rate at the maximum capacity as demonstrated by the diminution of the rETR values (Fig. SD1). This contrasts with its behaviour when grown under 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Heydarizadeh et al., 2017).

References:

- Barber, J. (1995). Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 201–208.
- Eilers, P. H. C., and Peeters, J. C. H. (1988). A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling* 42, 199–215. doi: 10.1016/0304-3800(88)90057-9.
- Heydarizadeh, P., Boureba, W., Zahedi, M., Huang, B., Moreau, B., Lukomska, E., et al. (2017). Response of CO₂-starved diatom *Phaeodactylum tricorutum* to light intensity transition. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160396. doi: 10.1098/rstb.2016.0396.

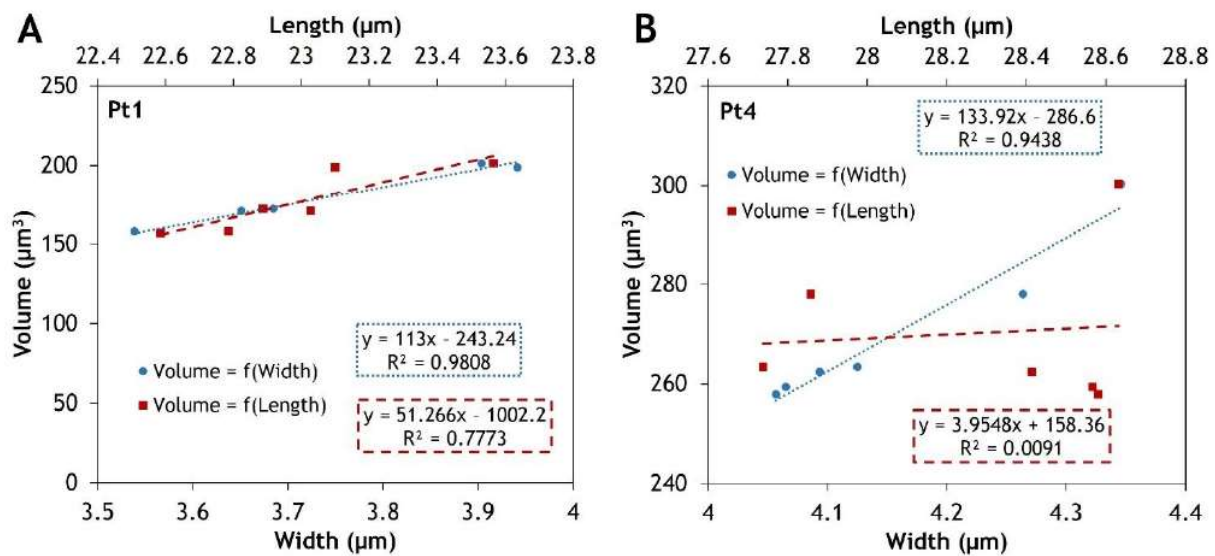
- Horton, P., and Ruban, A. V. (1992). Regulation of photosystem II. *Photosynth Res* 34, 375–385. doi: 10.1007/BF00029812.
- Nguyen-Deroche, T. L. N., Caruso, A., Le, T. T., Bui, T. V., Schoefs, B., Tremblin, G., et al. (2012). Zinc affects differently growth, photosynthesis, antioxidant enzyme activities and phytochelatin synthase expression of four marine diatoms. *The Scientific World Journal* 2012, 1–15. doi: 10.1100/2012/982957.
- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50, 333–359. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.333.
- White, A. J., and Critchley, C. (1999). Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynth Res* 59, 63–72. doi: 10.1023/A:1006188004189.

Supplementary Figure S1



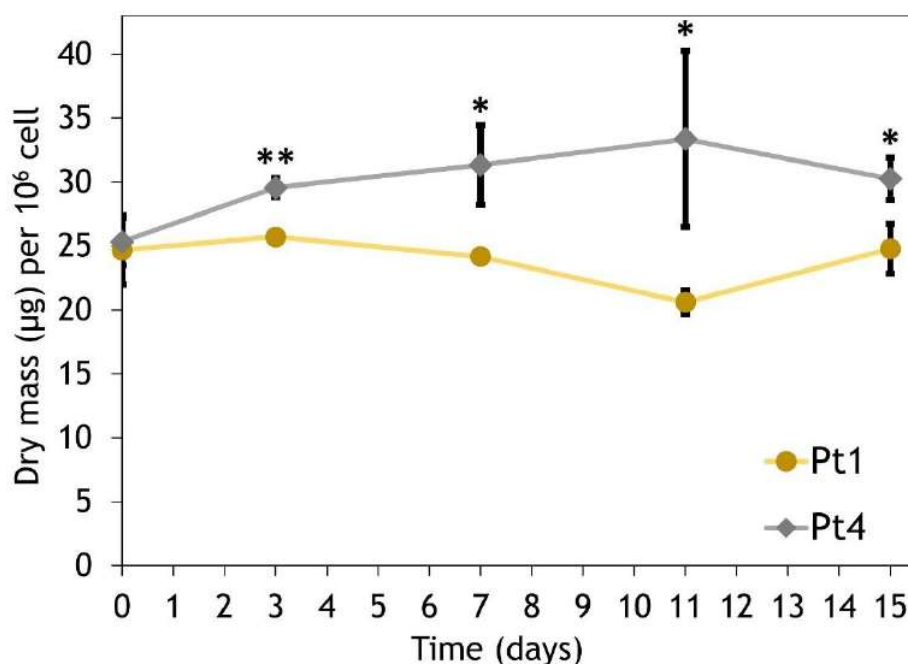
Examples of views from the 3D models of *P. tricornutum* (A) Pt1 (at D7) and (B) Pt4 (at D11) showing the bilobed shape of plastids. The plastid was modelled as a magenta 3D shape where chlorophyll autofluorescence was detected, lipid droplets are modelled as green 3D shapes where Bodipy 505-515 fluorescence was detected. The scale bar measures 5 μm .

Supplementary Figure S2



Relationship between cell volume and cell length and width in populations of (A) Pt1 and (B) Pt4 sampled at different timepoints of N starvation and N resupply. Each value is a Mean ($n=2517-7887$).

Supplementary Figure S3



Evolution of dry weight content during a N-starvation experiment on cultures of Pt1 and Pt4 ecotypes. Cultures were conducted in biological triplicate under a continuous white LED-light illumination at 20°C. Dry weight was determined by harvesting 20 mL of culture by filtration on 0.22 µm GF-C glass fiber filters (Whatman). The filters were washed twice with ammonium formate (1 mol/L) to remove the salt and dried for 24h at 60°C. Asterisks denote a difference between the two ecotypes (*t-test*: *, 0.01 < *p-value* < 0.05; **, 0.001 < *p-value* < 0.01).

Supplementary Table S1

Evolution of width, length and estimated volume of Pt1 and Pt4 cells during a N starvation followed by a N resupply.

Time	Width (µm)		Length (µm)		Estimated volume (µm ³)	
	Pt1	Pt4	Pt1	Pt4	Pt1	Pt4
D0	3.94 ± 0.79	4.26 ± 0.76	23.10 ± 3.51	27.86 ± 5.18	198.87 ± 104.87	278.04 ± 129.00
D3	3.90 ± 0.89	4.06 ± 0.77	23.56 ± 3.42	28.57 ± 5.02	201.40 ± 119.68	259.43 ± 124.52
D7	3.68 ± 0.73	4.09 ± 0.75	22.89 ± 3.57	28.41 ± 5.31	172.42 ± 96.46	262.41 ± 130.22
D11	3.54 ± 0.67	4.06 ± 0.72	22.79 ± 3.70	28.58 ± 5.04	158.03 ± 90.45	257.92 ± 120.54
h24	3.65 ± 0.77	4.35 ± 0.85	23.03 ± 3.49	28.63 ± 5.05	171.04 ± 99.39	300.36 ± 150.01
h72	3.57 ± 0.61	4.12 ± 0.85	22.58 ± 3.70	27.74 ± 5.06	156.88 ± 76.36	263.50 ± 140.50

Results are expressed as Mean ± Standard deviation (n = 2517-7887)

**2 – Approche de criblage utilisant les données bioinformatiques pour
l'identification et la caractérisation d'enzymes lipolytiques de la diatomée
marine *Phaeodactylum tricornutum***

2.1 – Contexte et principaux résultats

Les résultats de l'article 1 nous ont permis d'établir que lors de la resupplémentation en azote, les LD accumulées en carence sont fragmentées et s'éloignent du plaste (et possiblement de la mitochondrie). Que cela soit par lipolyse ou lipophagie, les deux mécanismes agissant potentiellement chez les diatomées (Nonoyama et al., 2019), il est nécessaire d'identifier les enzymes qui contribuent à la dégradation des triglycérides stockés dans les LD : les lipases.

Peu de lipases ont été étudiées expérimentalement chez *P. tricornutum* ou chez les diatomées en général. Seulement trois TG lipases ont été caractérisées par inactivation et/ou sur-expression : la tgl-1 (Phatr3_J1971) (Barka et al., 2016) localisée récemment dans la membrane la plus externe du plaste (cERM) (Huang et al., 2023b), la Om-TGL (Phatr3_J37711) localisée dans la membrane périplastidiale (Li et al., 2018), et l'homologue de CGI-58 (Phatr3_J54974) localisé dans la mitochondrie (Calleja et al., 2015; Shu et al., 2023).

Quelques protéines contenant des domaines de lipases ont toutefois été caractérisées chez *P. tricornutum* ou d'autres diatomées. Une *patatin-like phospholipase domain-containing 3* (PNPLA3) a été identifiée chez *P. tricornutum* (Phatr3_J46511) par homologie avec *Homo sapiens*, mais elle ne semble pas fonctionner comme TG lipase (Wang et al., 2015). Elle pourrait toutefois avoir une fonction de dégradation de lipides polaires. De nombreuses autres lipases ont été identifiées dans les génomes de diatomées par homologie avec des lipases déjà connues. Une étude chez la diatomée *F. solaris* a ainsi identifié 42 lipases par homologie avec les lipases présentes chez d'autres organismes (Nomaguchi et al., 2018) et 49 lipases sont rapportées dans le génome de *P. tricornutum* (Barka et al., 2016).

L'objectif de cet article était d'identifier des lipases candidates à la lipolyse et/ou à la lipophagie. Pour cela, nous avons mis en place un criblage du génome de *P. tricornutum* par une approche bio-informatique. La démarche générale a suivi 5 étapes :

- 1 – repérer dans le génome annoté de *P. tricornutum* les protéines annotées comme lipases (162 protéines) et récupérer leurs séquences ;
- 2 – contrôler l'annotation de ces protéines dans deux bases de données (Pfam et ESTHER) et contrôler les séquences en éliminant celles qui ne possèdent pas les domaines conservés nécessaires à une fonction lipase (57 protéines) ;
- 3 – sur les 57 lipases potentielles identifiées à l'étape 2, plusieurs analyses ont été conduites pour en prédire certaines caractéristiques, comme des modifications post-traductionnelles ou la localisation sub-cellulaire. Pour ce dernier aspect, 3 lipases (Phatr3_J15323, Phatr3_J41624 et Phatr3_J45660) sont potentiellement localisées dans les vacuoles ;

4 – utiliser des jeux de données transcriptomiques publiquement disponibles établis chez *P. tricornutum* pendant une carence en nitrates pour obtenir la régulation des transcrits correspondant à chacune de ces protéines, et en sélectionner les plus régulées (9 protéines). L'hypothèse sous-jacente à cette troisième étape était que les transcrits régulés lors d'une carence azotée répondraient à une resupplémentation par une régulation opposée, comme cela a déjà été observé pour des lipases de microalgues (Li et al., 2012; Siegler et al., 2017; Tsai et al., 2018) ;

5 – prédire la structure tertiaire des 9 lipases les plus régulées prédite par l'algorithme Alphafold2 afin de contrôler que leur structure était plausible (résidus catalytiques regroupés en un site actif par exemple), et d'observer d'éventuelles caractéristiques des lipases comme la présence de volets (*lids*) ou de couvercles (*caps*) au-dessus du site actif. Cette analyse a permis d'éliminer l'une des 9 protéines.

Cette approche a identifié des cibles pour de futures études : suivi de l'expression des transcrits après resupplémentation (**partie III.3**), études fonctionnelles d'inactivation ou de sur-expression, purification pour prédire leurs caractéristiques enzymatiques.

2.2 – Article 2

Article publié :

Murison, V.; Hérault, J.; Schoefs, B.; Marchand, J.; Ulmann, L. Bioinformatics-Based Screening Approach for the Identification and Characterization of Lipolytic Enzymes from the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs* 2023, 21, 125. <https://doi.org/10.3390/md21020125>.

Article

Bioinformatics-Based Screening Approach for the Identification and Characterization of Lipolytic Enzymes from the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*

Victor Murison ¹, Josiane Hérault ¹, Benoît Schoefs ² , Justine Marchand ² and Lionel Ulmann ^{1,*} 

¹ BiOSSE, Biology of Organisms: Stress, Health, Environment, Département Génie Biologique, Institut Universitaire de Technologie, Le Mans Université, F-53020 Laval, France

² BiOSSE, Biology of Organisms: Stress, Health, Environment, UFR Sciences et Techniques, Le Mans Université, F-72085 Le Mans, France

* Correspondence: lionel.ulmann@univ-lemans.fr

Abstract: Oleaginous diatoms accumulate lipids of biotechnological interest when exposed to nutrient stress conditions such as nitrogen starvation. While accumulation mechanisms are well-known and have been engineered to improve lipid production, degradation mechanisms remain poorly investigated in diatoms. Identifying lipid-degrading enzymes is the initial step to understanding the catabolic processes. In this study, an in silico screening of the genome of *Phaeodactylum tricornutum* led to the identification of 57 putative triacylglycerol lipases (EC 3.1.1.3) grouped in 4 families. Further analysis revealed the presence of conserved domains and catalytic residues of lipases. Physico-chemical characteristics and subcellular localization predictions highlighted that a majority of these putative proteins are hydrophilic and cytosolic, suggesting they could be recruited to lipid droplets directly from the cytosol. Among the 57 identified putative proteins, three lipases were identified as possibly involved in lipophagy due to a potential vacuolar localization. The expression of the mRNA corresponding to the 57 proteins was then searched in 3 transcriptomic datasets obtained under nitrogen starvation. Nine genes were highly regulated and were considered as encoding enzymes with a probable important function in lipid catabolism. A tertiary structure prediction of these nine candidates yielded eight functional 3D models. Among those, two downregulated enzymes, Phatr3_J54974 and Phatr3_EG00720, were highlighted as good targets for future functional genomics and purification studies to investigate their role in lipid degradation.

Keywords: diatom; *Phaeodactylum tricornutum*; lipase; transcriptomics; nitrogen starvation



Citation: Murison, V.; Hérault, J.; Schoefs, B.; Marchand, J.; Ulmann, L. Bioinformatics-Based Screening Approach for the Identification and Characterization of Lipolytic Enzymes from the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 125. <https://doi.org/10.3390/md21020125>

Academic Editors: Pasquale De Luca and Chiara Lauritano

Received: 16 January 2023

Revised: 13 February 2023

Accepted: 14 February 2023

Published: 14 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Diatoms form a group of eukaryotic microalgae found in all ecosystems, including the narrowest ones [1,2]. Diatoms contribute to around 20% of global carbon fixation [3,4]. During a nutrient stress, especially a nitrogen starvation or limitation, diatoms accumulate storage compounds [5,6]. Some oleaginous species can accumulate up to 60% of their biomass as triacylglycerol (TAG) [7]. Moreover, these species can reach high biomass productivity. Hence, diatoms can be considered as a promising source of biodiesel [8]. Additionally, diatom lipid profiles are rich in omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA), essential components of human nutrition with beneficial properties in the development of infants and for a good cardiovascular health [9].

Produced TAG under stress are stored in specific compartments, namely lipid droplets (LD). LD consists in a hydrophobic core made of TAG enclosed in a monolayer membrane of polar lipids associated with proteins [10,11]. The metabolic pathways leading to an accumulation of lipids have been extensively investigated in the diatom model *Phaeodactylum tricornutum*, using several strategies including the exposure to nutrient deficiencies [12,13],

the addition of inorganic and organic carbon in the medium [14,15], changes in the light regime [16,17], or the use functional genomics tools. The latter studies led to strains with enhanced lipid production and/or content in EPA. Two main strategies have been followed: (1) the “pull” strategy where fixed carbon is directed towards TAG and/or EPA by overexpressing enzymes encoding rate-limiting steps in the biosynthetic pathways [18–23], and (2) the “push” strategy where the production of precursors (including fatty acids, acetyl-CoA and reducing equivalents) is enhanced by overexpressing enzymes such as the malic enzymes [24–26], or by inactivating other precursor consuming pathways such as the production of sterols [27] or of polysaccharides [28,29]. A third strategy can be used to produce high lipid strains: suppress the processes that degrade lipids (“protect” strategy) [30]. Two lipid catabolic pathways are supposed to be active and both involve lipolytic enzymes: lipolysis and lipophagy [31,32]. Lipolysis occurs at the membranes of LDs where lipolytic enzymes can access the hydrophobic core and produce fatty acids and glycerol by hydrolysis. Lipophagy occurs through the process of autophagy. LDs are transported to the vacuole where specific enzymes functioning in acidic conditions degrade them. Among lipolytic enzymes, TAG lipases (EC 3.1.1.3) are able to hydrolyze the ester bond that links medium to long chain fatty acids to the glycerol backbone of TAG [33]. TAG lipases belong to the α/β hydrolases, a family of enzymes characterized by a specific fold consisting of one β sheet surrounded by two layers of α helices, and the presence of a GX SXG pentapeptide motif [34]. Some patatin-like phospholipases and GDSL lipases, which are not α/β hydrolases, may also degrade TAG [35–37]. Patatin-like phospholipases include the GX SXG motif and often have a phospholipase A2 activity (EC 3.1.1.4) while GDSL lipases are characterized by a distinct highly conserved N-terminal GDS(L) motif and can have various activities such as arylesterase (EC 3.1.1.2) or lysophospholipase (EC 3.1.1.5) [38].

Among the 49 proteins annotated as lipases in the genome of *P. tricornutum*, only 3 have been studied by functional genomics approaches. These three proteins are reported as a patatin-like lipase (tg1, Phatr3_J1971) [30], a plastid localized lipase (OmTGL, Phatr3_J37711) [39] and a homolog of the human CGI-58 lipase activator known to have a TAG lipase activity in diatoms (Phatr3_J54974) [40,41]. In these studies, a knockdown of the lipase gene led to an increase in lipid accumulation while slightly affecting the cell density reached at the stationary phase, either by enhancing (+17%), or by decreasing it (−6 to −10%). Additional studies have been conducted on other diatoms with the knockdown of a CGI-58 homolog in *Thalassiosira pseudonana* [42] and of a tg1 homolog in *Fistulifera solaris* [43], both showing an increase in lipid accumulation while not affecting division rate [42] or even enhancing it [43]. This inactivation approach therefore allows to obtain strains displaying a high lipid productivity. An overexpression of certain lipases may also unexpectedly lead to an enhanced production of neutral lipids, as recently observed with the CGI-58 homolog overexpression in *P. tricornutum* (Phatr3_J54974), suggesting a central and complex role of this protein in the regulation of lipid homeostasis [41]. Moreover, the high number of uncharacterized lipases in *P. tricornutum* could also be a source for the discovery of biotechnologically relevant enzymes, as lipases are widely used in industrial processes [44].

The above-described studies have all focused on one protein at a time to highlight their eventual functional role. However, such an approach does not provide a global view of all the potentially active lipases. In the present study, an in silico screening analysis of the *P. tricornutum* genome and transcriptome has been conducted to identify a complete set of the lipolytic enzymes participating in lipid degradation processes. This work aims at elucidating key enzymes in the lipid catabolism response of *P. tricornutum* to changes in nitrate availability, a necessary first step to enhance lipid production by functional genomics. Our main working hypothesis to look for functionally relevant enzymes is that highly regulated proteins during a nitrogen starvation are also involved in the response to a nitrogen resupply with an opposite regulation, as previously observed for lipases in other microalgae [45–47]. Thus, in this work, candidate lipase protein sequences were

retrieved from the genome of *P. tricornutum* and used for predicting their 3D conformation, physico-chemical characteristics as well as their cellular localization(s). Their involvement in lipid homeostasis is discussed on the basis of transcriptomic data.

2. Results and Discussion

2.1. Retrieval of Sequences and Annotation Screening Confirm the Existence of a High Number of Putative Lipases in *P. tricornutum*

The search of the keywords “lipase”, “phospholipase” and “alpha/beta hydrolase” in the Phatr3 annotation of the *P. tricornutum* genome [48] yielded 162 putative protein sequences, of which 90 have a significant annotation (E-value < 10^{-5}) in the pfam database. Additional screenings through sequence investigation and ESTHER database homology search narrowed the total to 74 putative protein sequences (Table S1). Among them, 58 proteins with a potential TAG lipase function grouped in four families annotated as α/β hydrolase (24 proteins), class 3 lipases (18 proteins), GDSL-like lipases (8 proteins) and patatin-like phospholipases (8 proteins). Sequence alignment was performed to retrieve conserved motifs.

2.2. Multiple Sequence Alignment Allows the Identification of Conserved Domains and Residues

Among amino acid residues present in the catalytic site, the activity of TAG lipases, including GDSL lipases, is due to three residues: a serine (S), an acidic amino acid (aspartic or glutamic acid, D or E) and a histidine (H). The reaction center of patatin-like lipases requires only two active residues, the serine and the acidic amino acid [49]. The multiple sequence alignment of each family revealed that possible catalytic residues are localized at mostly conserved positions across sequences (Figure 1). The acidic residue and histidine are found at isolated positions (not in a conserved motif) in α/β hydrolases (635 and 680 respectively, Figure 1A), class 3 lipases (1633 and 1950, Figure 1B) and patatin-like lipases (950 acidic residue, Figure 1C). In GDSL lipases (Figure 1D), these residues are found within a conserved motif (665 and 668 respectively), as expected for this family of proteins [38]. Additionally, the catalytic histidine position of class 3 lipases does not appear to be highly conserved (1950, Figure 1B).

After inspection of the protein sequences, in all the four retained families, the catalytic serine was always found located within one characteristic domain, either a GDS(L) motif belonging to the N-terminal domain, or a central GX_1SX_2G pentapeptide motif where X_1 and X_2 are variable amino acids for α/β hydrolases, class 3 lipases and patatin-like lipases.

For the class 3 lipase family, GHSLG (1523, Figure 1B) is the most common pentapeptide motif, as already observed for lipases from fungi (e.g., *Rhizomucor miehei*) [50], from the green microalga *Chlorella* sp. [51] and from the diatom *Fistulifera solaris* [52].

For α/β hydrolases, amino acids at positions X_1 and X_2 are variable: at X_1 , the most common residue is a histidine representing 33% of the sequences, while at X_2 a majority of sequences displays a hydrophobic residue (I, L, M, V, A). For patatin-like phospholipases, X_1 is either A, S or T while X_2 is A, T or G which is also common for this class of proteins [35,53]. Based on the alignment, two sequences, the α/β hydrolase Phatr3_J40695 and the class 3 Phatr3_EG01544 did not seem to contain the active pentapeptide, however, closer inspection of their sequence revealed that they contained respectively a GVSHG and a GRSTG pentapeptide motif (not apparent in Figure 1). Hence, they were kept in the dataset.

For GDSL lipases, the N-terminal motif (GDS at position 354) is conserved across sequences, except for Phatr3_J47870 which contained a GDE motif lacking the catalytic serine (Figure 1D). It is hence probably inactive and was excluded from further analysis. Thus, only 57 proteins of the 58 initially retained were subjected to physico-chemical characteristics prediction (see Section 2.3).

Besides catalytic residues, other amino acids are necessary for the activity of lipolytic enzymes. During TAG cleavage, reaction intermediates are stabilized by hydrogen bonds with the backbone of two amino acids which form a structure named the oxyanion hole.

One of these two amino acids is the X₂ residue in the conserved pentapeptide motif, while the second one is reported to be located in the N-terminal region of the protein. This second residue has been used to define three main classes of lipases: GX, GGGX and Y [33] where the most commonly found GX and GGGX types. In our work it can be inferred that all α/β hydrolases and class 3 lipases belong to the GX type, where X is the active residue (304, Figure 1A; 1414, Figure 1B). Patatin-like phospholipases display a motif resembling GGGX type (Figure 1C). We observed that X is mainly T (1414, Figure 1B) in class 3 lipases, as previously described in filamentous fungi lipases [54]. For GDSL lipases (Figure 1D), a distinct oxyanion hole motif is formed by the catalytic serine, associated with a conserved glycine and asparagine in two distinct sequence blocks as previously reported [33].

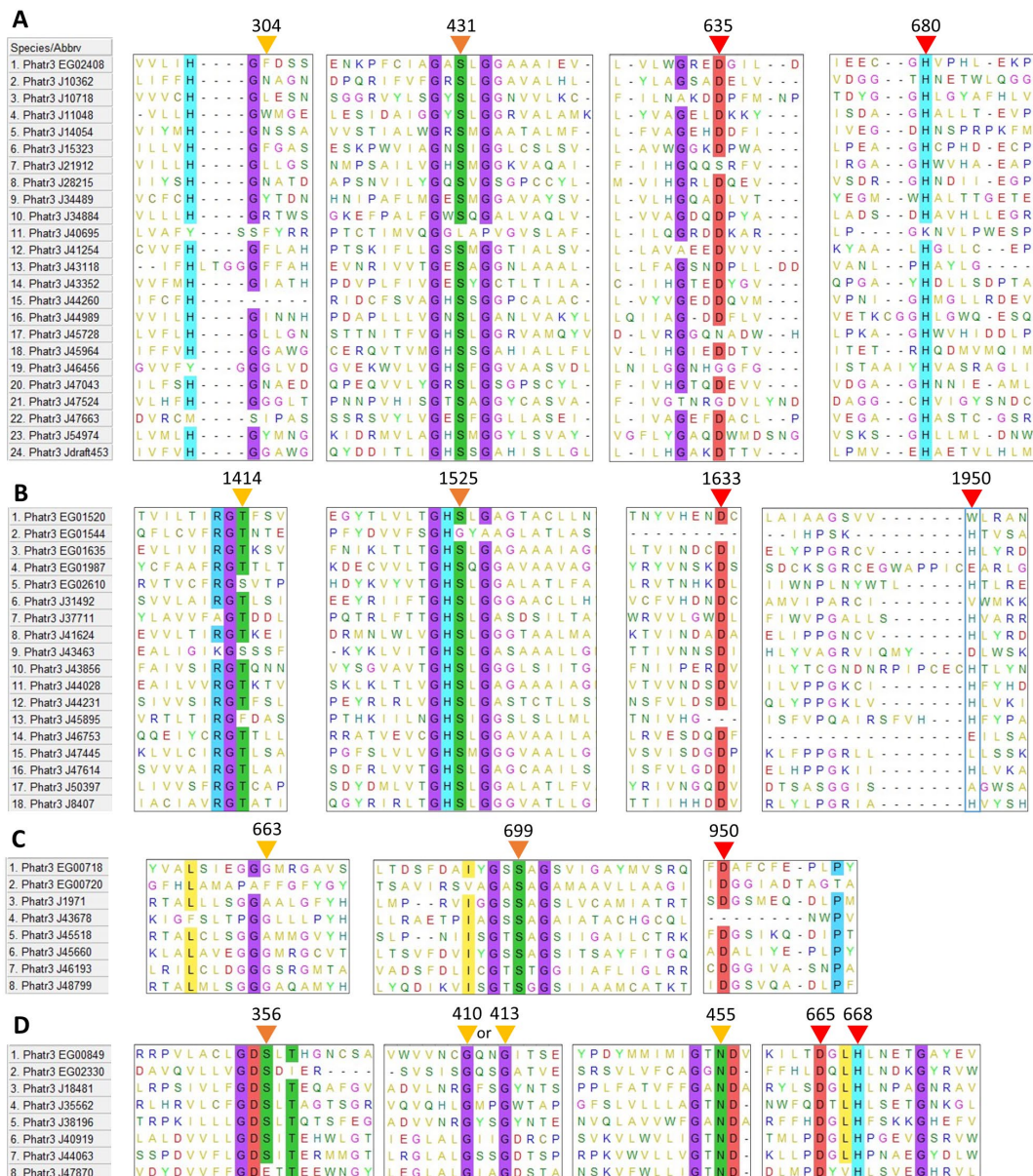


Figure 1. Multiple sequence alignment of putative amino acid sequences of lipases identified in the genome of *P. tricornutum*. (A): α/β hydrolases, (B): Class 3 lipases, (C): Patatin-like lipases, (D): GDSL lipases. Positions of possible residues of interest are indicated with triangles: yellow for oxyanion hole residues, orange for the catalytic serine, red for other catalytic residues. Residues conserved in more than 80% of the sequences are highlighted. Residue positions are only indicative as they include gaps created by the process of alignment.

In lipases containing the pentapeptide motif, the type of oxyanion hole is a factor of substrate specificity: GX type lipases usually hydrolyze medium and long carbon chains, while GGGX type is more specific towards short length substrates [54]. Indeed, the fatty acid profile of *P. tricornutum* TAG is mainly composed of medium and long-chain fatty acids (C14:0, C16:0 and C16:1) [55] which is in line with GX type lipases that could degrade them. For patatin-like phospholipases, even though their oxyanion hole motif resembles a GGGX type, some homologs from different microalgae have been shown to hydrolyze TAG with long to very long chain fatty acids [30,43,45,56].

2.3. Physico-Chemical Characteristics Provide General Information about Candidate Lipolytic Enzymes and Insights of In Vivo Function

The ProtParam server provided a range of parameters for predicting the different physico-chemical properties of the 57 candidate proteins (Table S2). The length of the sequences ranged from 253 to 1709 amino acid residues (molecular weights (MW) from 28.8 to 186 kDa) (Figure 2A). Isoelectric points (pI) ranged from 4.94 to 9.68 (Figure 2A). These values are compatible with the global range of *P. tricornutum* proteins as obtained from proteomic data which MW goes from 10–150 kDa (with a few outliers bigger than 150 kDa) and pI from 2 to 10 [57]. Lipases from bacteria and fungi are reported to have MW going from 19 to 60 kDa [44]. The higher MW obtained for *P. tricornutum* lipases could be explained by longer sequences with additional domains such as transmembrane domains, as reported for *Chlorella* sp. [51]. Independently of their families, the candidate lipases can also be separated into two major pI groups: an acidic one ranging from 5 to 6 and a basic one ranging from 8 to 10 (Figure 2A). A pI bimodal distribution that excludes the physiological pH of 7.5 is a common feature of proteomes from all domains of life and is expected as proteins are usually less soluble and reactive in a pH close to their pI [58]. Both MW and pI are useful characteristics to identify enzymes during a purification process.

The aliphatic index is an indicator of the volume occupied by aliphatic amino acid residues (alanine, isoleucine, leucine and valine) which provides an indication of thermal stability. Proteins with a proven thermostable character have an index value higher than 80 [59]. In candidate lipases, the aliphatic index ranged from 74.05 to 103.19, suggesting that most proteins are thermally stable which is an interesting feature for isolation and purification (Figure 2B).

The instability index is an estimator of in vivo stability of a protein, often used for estimating in vitro stability [60,61]. Proteins above an instability index of 40 are considered unstable, which means that their in vivo half-life is lower than 5 h, while stable proteins have an instability index under 40 and a half-life higher than 16 h [61]. Independently of their families, 75% of the candidate proteins were predicted to have a short in vivo half-life (Figure 2C). This feature is coherent with a function as stress-responsive candidate lipases that would be produced only for a transitory lipid degradation process. Indeed, a short half-life is common for proteins involved in the response to perturbations as a rapid degradation is necessary to induce changes in protein abundance that allow a metabolic response [62].

The GRAVY score is an indicator of protein hydrophobicity or hydrophilicity, this score being positive for hydrophobic proteins [63]. Here the GRAVY scores ranged from -0.52 to 0.143 with a majority of hydrophilic proteins (Figure 2D). Only six proteins displayed a slight average hydrophobic character, including members of the four described families (see Section 2.1). Lipases are generally interfacial proteins, meaning that their activity is maximal when they are located at the interface between water and a lipidic compartment or membranes [33], hence they have both lipid-interacting hydrophobic domains and more abundant hydrophilic ones that permit storage in the cytosol. The interfacial character of lipases permits the hydrolysis of TAG stored in lipid droplets (LDs). LDs are dynamic compartments surrounded by a single layer membrane made of phospholipids and proteins. Two classes of LD proteins have been defined based on association dynamics: class I proteins are embedded in the LD membrane through a hairpin domain and are located at the Endoplasmic Reticulum (ER) membranes in the absence of

LDs, while class II proteins are recruited to the LD surface directly from the cytosol [64]. The general hydrophilic character of the analyzed proteins suggests that they cannot be permanent residents in lipidic compartments and are thus probably class II proteins.

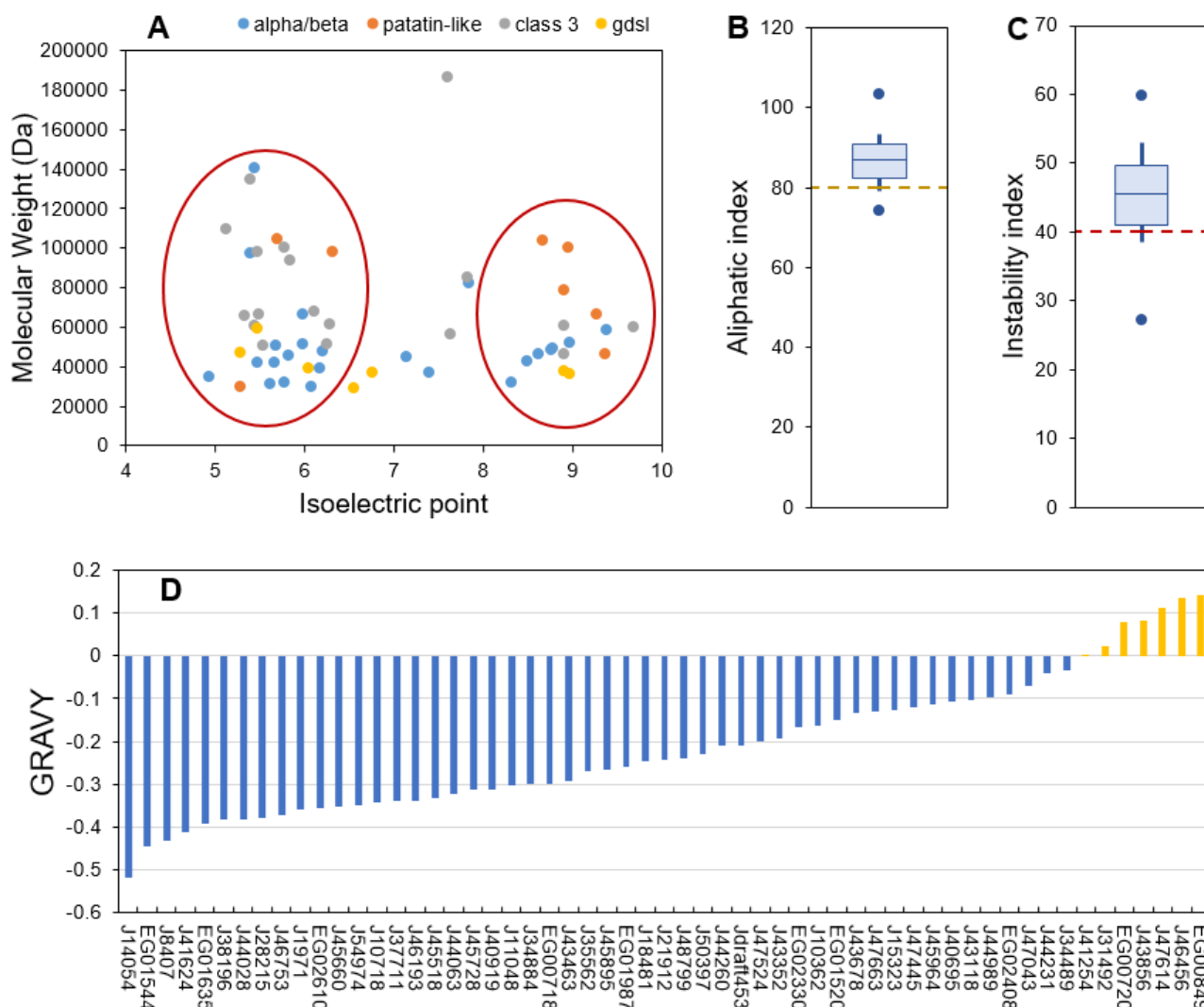


Figure 2. ProtParam calculated physico-chemical characteristics of the candidate lipases. (A): molecular weight as a function of isoelectric point, (B): aliphatic index, (C): instability index, (D): Grand Average of Hydropathy (GRAVY) score). For aliphatic and instability indexes boxplots, the central bar indicates the median, boxes indicate first and third quartiles, error bars indicate first and ninth deciles, and endpoints indicate maximum and minimum values.

2.4. Predicted Subcellular Localization Varies across Families and Is Mainly Cytosolic

Subcellular localization is an important parameter to determine the *in vivo* function of proteins. Predictions obtained through a combination of various freewares are displayed in Figure 3 and Table S3. Overall, 35 (61%) of the putative lipases are predicted to be cytosolic, and 9 (16%) are predicted as cytosolic or associated to the ER, as they contain at least one predicted transmembrane domain. The remaining proteins (23%) are assigned to the chloroplast, ER, mitochondria and peroxisomes. Patatin-like and GDSL lipases are all assigned to the cytosol and/or the ER. Proteins of the α/β hydrolase family and class 3 lipases were located in all the possible individualized compartments.

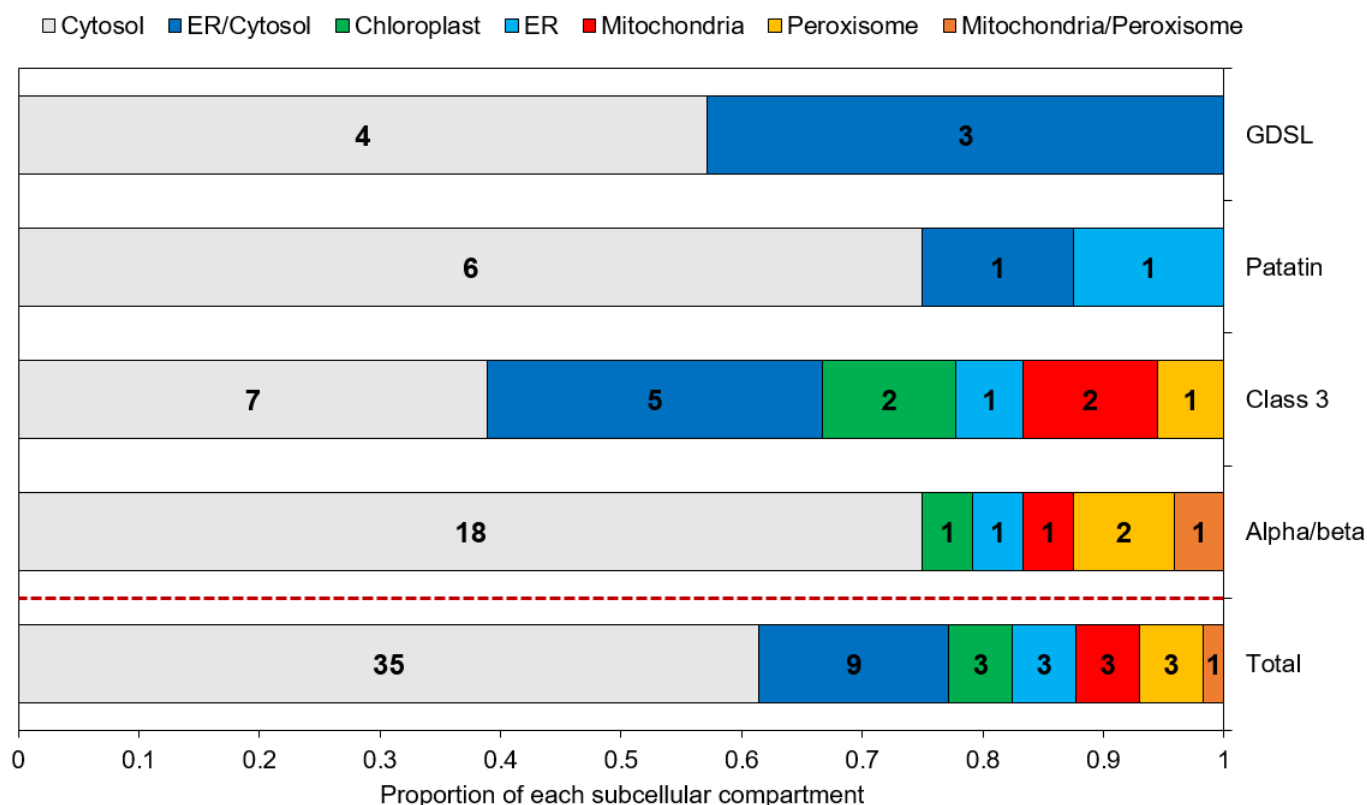


Figure 3. Predicted subcellular localization of the candidate lipases. Numbers inside each box indicate the number of proteins assigned to the corresponding compartment.

In various species, lipases have been shown to be co-located with LDs, permitting direct lipolysis as it is the case for the human adipose triglyceride lipase [36], for the sugar-dependant-1 (SDP-1) lipase in germinating seeds of *Arabidopsis* [35], or for two TAG lipase of the green alga *Chromochloris zofingiensis* expressed in yeast cells [65]. However, no tool is currently able to predict a localization to lipid droplets. Hence, such a prediction can only rely on previous studies and known addressing mechanisms.

Four studies aiming at determining the LD proteome of *P. tricornutum* have been conducted, using a nitrogen starvation as the stress condition permitting an accumulation of TAG and the subsequent formation of LDs [10,11,66,67]. In these proteomic datasets, except for one α/β hydrolase, Phatr3_J43352 which was found in the LD proteome of *P. tricornutum* Pt4 strain [10], no annotated TAG lipase has been reported. This result is in line with our previous assumption of candidates being class II LD-associated proteins based on their general hydrophilic character and their cytosolic subcellular localization.

As almost no lipase was found in LD proteomes, lipases could be produced and translocated to LDs only in situations where TAG are degraded. Indeed, it was observed in different species of microalgae, that nitrogen resupply acts as a switch for the expression of TAG lipase genes [45–47]. Lipases can also be produced during lipid accumulation and being translocated to LDs once nitrogen is resupplied. Such a scenario occurs for SDP-1 lipase in *Arabidopsis* with an overexpression of its gene in accumulation conditions, a storage of the protein in the peroxisome and then a delivery to LDs in degradation conditions [68]. Both possibilities imply a transfer mechanism from the cytosol or an organelle to the LDs. Cytosolic proteins can associate transiently to LDs through structural features such as proline rich regions and amphipathic helices, or after post-translational modifications such as acylation or prenylation [64,69].

In our dataset, a prediction of acylation and prenylation sites using GPS-lipid shows that 36 out of 57 proteins have at least one site for these modifications (Table S4, Figure 4): 70% are sites of S-palmitoylation (Figure 4A), a modification known to enhance the hy-

drophobic character of a protein allowing better interactions with membranes [70]. This could be an important mechanism of protein-LD interaction during lipid catabolism. All the four families of proteins include predicted sites for such a modification, but two proteins have more than four predicted sites: the patatin-like lipase Phatr3_J46193 (six sites) and the class 3 lipase Phatr3_J47614 (nine sites) (Figure 4B). The latter was also one of the proteins with a slightly positive (hydrophobic) GRAVY score, suggesting a possible interaction with membranes and/or LDs.

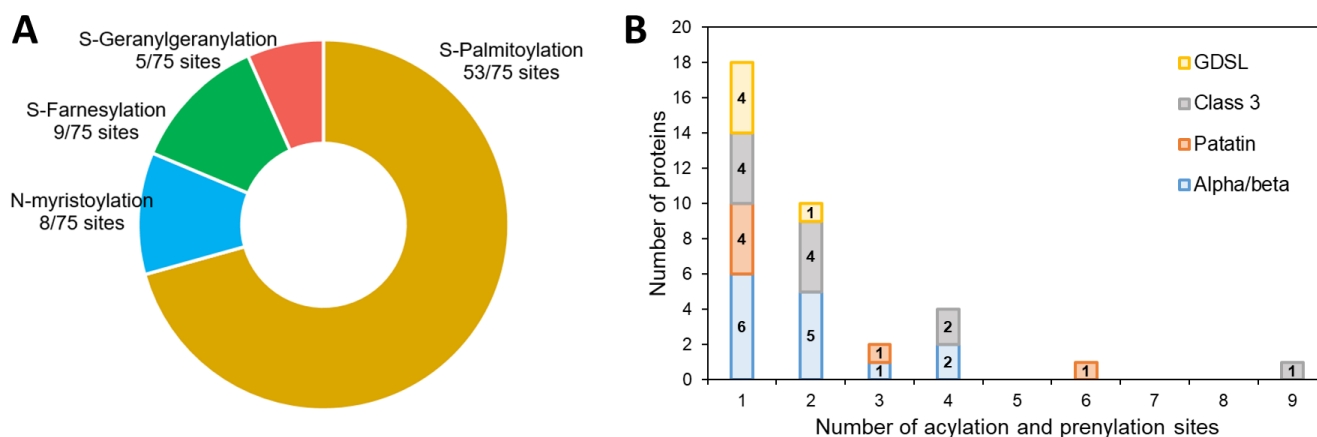


Figure 4. Prediction of acylation and prenylation sites of the candidate lipases. (A): proportion of each kind of modification in predicted sites, (B): number of modifications per protein distribution.

Along with structural features, another possibility for the transfer of proteins between compartments could be the establishment of membrane contact sites as it occurs for SDP-1 lipase in *Arabidopsis*: SDP-1 is transferred from the peroxisomes to the LDs [68]. Close contact between LDs and peroxisomes and mitochondria have also been observed in the green microalgae *Micrasterias denticulata* and *Chlamydomonas reinhardtii* [71,72]. Moreover, membrane contact sites between LDs and other organelles have been reported to allow the transfer of lipids and other reaction products between compartments [64]. In diatoms, the β -oxidation of fatty acids occurs mainly in mitochondria and possibly in peroxisomes [73] so lipases assigned to these organelles could have access to TAG molecules through membrane contact sites.

To explain the apparent absence of lipases from LDs proteomes obtained during nitrogen starvation, it can also be hypothesized that a large share of lipid consumption occurs by lipophagy. This process uses the mechanisms of autophagy to consume LDs by translocating them to the vacuole where lipases degrade the TAGs they contain. In this hypothesis, active lipases would be found mainly in the vacuole. However, protein targeting to the vacuole is not well-characterized in diatoms. It seems that a di-leucine based motif ([D/E]-XXXL-[L/I] or DXXLL) is necessary along with a signal peptide [74]. Here, only one α/β hydrolase (Phatr3_J15323), one class 3 lipase (Phatr3_J41624) and one patatin-like lipase (Phatr3_J45660) were predicted to be ER targeted (Figure 3). Hence, they could be located further in the secretory pathway, including Golgi, vacuole, plasma membrane or extracellular space localization. Inspection of the sequences from these three proteins indicates they contain di-leucine motifs and could hence be lipases acting in the process of lipophagy.

2.5. Transcription Data Reveal Contrasting Regulation across All Candidate Lipases

It is well-known that nitrogen starvation induces TAG accumulation in diatoms, mainly through a recycling of polar lipids [75], however the role of TAG lipases in this accumulation process is mostly unknown. As their main function is to degrade TAG, expression of these proteins is expected to be downregulated during a nitrogen stress, and to be upregulated when nitrogen is resupplied.

To identify in our dataset which candidate lipases are responsive to stress conditions, the regulation of their transcripts, expressed as a log₂ value, was retrieved from three experiments that specifically investigated the response of the whole cell to nitrogen starvation over time [75–77]. The three datasets exposed *P. tricornutum* cultures to a shift from standard nitrate-containing f/2 medium to nitrate deprived f/2. Those of Matthijs et al. (2016) [77] and Alipanah et al. (2015) [76] describe the response of the Pt1 ecotype (CCAP 1055/1) to a nitrogen stress in batch cultures during respectively 4 to 20 h and 48 to 72 h. The transcriptomic dataset of Scarsini et al. (2022) [75] monitors the response of the Pt4 ecotype (UTEX 646) during 15 days in a progressive transition to nitrogen deprivation.

The regulation of each putative lipase at every time point of the three experiments is reported in Table S5, and the highest regulation level observed over all datasets is shown in Figure 5.

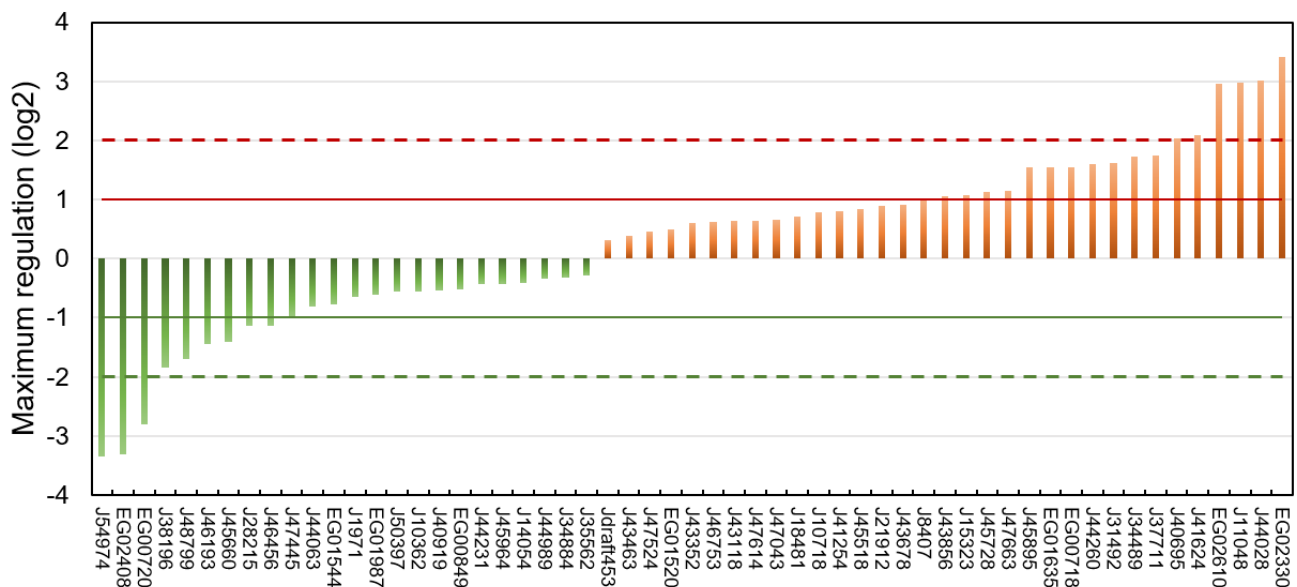


Figure 5. Maximum regulation expressed as log₂ compared to a non-stressed situation observed across datasets [75–77] and all time points for each of the putative lipases.

Of the 57 putative lipases, 24 were downregulated and 33 upregulated. Considering a threshold of absolute log₂ fold change of 1, 9 lipases were downregulated and 17 upregulated.

Downregulated putative lipases during a nitrogen deficiency might be involved in the catabolism of neutral lipids stored in LDs during a nitrogen resupply. Among these lipases, the CGI-58 homolog Phatr3_J54974 (log₂ −3.35) and the possible vacuolar lipase Phatr3_J45660 (log₂ −1.41) can be cited. The patatin-lipase Phatr3_46193, for which an homologue has a galactolipase activity in *Pseudo-nitzschia* sp. [78], was also down-regulated (log₂ −1.44). This is surprising because it has been previously described that during a nitrogen starvation in *P. tricornutum*, galactolipids are degraded and their acyl chains transferred to newly formed TAG [55,75].

It seems paradoxical that some putative TAG lipases are upregulated during neutral lipid storage. However, it has already been reported that lipases can also hydrolyze other substrates such as polar lipids from which acyl chains can be incorporated into newly formed neutral lipids in a process of recycling [55,75,79]. Indeed Nomaguchi et al. (2018) have found in the diatom *Fistulifera solaris* that some lipases are upregulated, while others are downregulated under lipid degradation conditions [52]. Upregulated candidate lipases include the plastid-located Phatr3_J44028 (log₂ 3.02) and the other possible vacuolar lipases Phatr3_J41624 (log₂ 2.09) and Phatr3_J15323 (log₂ 1.02). Surprisingly, upregulated putative lipases also include the lipase OmTGL (Phatr3_J37711, log₂ 1.75) previously reported to

hydrolyze TAG enriched in EPA and for which a knockdown enhanced TAG content in the cell [39].

Overall, only nine proteins showed a maximum regulation of their transcripts higher than an absolute $\log_2 > 2$ (Table 1). These highly regulated lipases were chosen as the most plausibly involved in lipid metabolic processes and hence selected for the modelling of their 3D structure.

Table 1. Characteristics of the nine candidate lipases showing the highest regulation.

Protein ID (Phatr3)	Family	Regulation (log2)	GRAVY	Predicted Localization
J54974	α/β	−3.35	−0.35	Cytosol
EG02408	α/β	−3.32	−0.091	Chloroplast
EG00720	Patatin	−2.80	0.078	ER/Cytosol
J40695	α/β	2.03	−0.108	Cytosol
J41624	Class 3	2.09	−0.411	ER and/or vacuole
EG02610	Class 3	2.96	−0.357	Cytosol
J11048	α/β	2.98	−0.304	Cytosol
J44028	Class 3	3.02	−0.381	Chloroplast
EG02330	GDSL	3.41	−0.168	Cytosol

2.6. Tertiary Structure Prediction of the Most Regulated Candidate Lipases Reveals a Functional Lipase Fold and Additional Domains That May Regulate Catalytic Activity

For each protein sequence, the AlphaFold algorithm was run twice on Colabfold, once with a search for templates for modelling, once without. For each protein, the best model of the two runs was retained according to Colabfold internal metric (predicted local Distance Difference Test, pLDDT). The positions of catalytic and possible oxyanion hole residues were investigated, and structures are reported in Figure 6. Structure inspection of the upregulated α/β hydrolase Phatr3_J40695 revealed that its pentapeptide GVSHG motif was outside of the α/β hydrolase fold domain, and that no potentially catalytic histidine could be found in a localization near the serine. Hence, it can be considered that it is not a lipase, and this protein was excluded from further analysis.

All the remaining proteins had a similar structure with a β sheet composed of β strands (in cyan in Figure 6) separated by α helices (in green in Figure 6). Class 3 lipases and α/β hydrolase shared the classic α/β fold, with eight β strands and six α helices and the conserved pentapeptide (including the catalytic serine) forming a nucleophilic elbow structure at the center of the fold, in a junction between a β strand and the following α helix [33]. Patatin-like lipase Phatr3_EG00720 displays a similar 3D arrangement of its pentapeptide but it is inside a β sheet made of only six β strands as previously described for this family of proteins [49]. For the GDSL lipase Phatr3_EG02330, the structure is also similar to other GDSL lipases with five β strands [80]. In all families, the catalytic and oxyanion hole residues were all grouped in one well-defined catalytic site located approximately at the center of the β sheet. For the patatin-like Phatr3_EG00720, as observed in the sequence alignment (Figure 1C), the oxyanion hole motif was different from that of other members of its family. However, one proline residue found near this position (661 in the alignment, Figure 1C) could serve as a stabilizing residue by presenting its backbone to the active site. Indeed, unusual but functional oxyanion hole residues exist within α/β hydrolases such as a Serine-Isoleucine motif for a hydrolase of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PA01 or a Proline-Phenylalanine motif for a N-acyl homoserine lactone degrading enzyme of the same strain [34]. Hence, all structures were plausible and consistent with previous structural data.

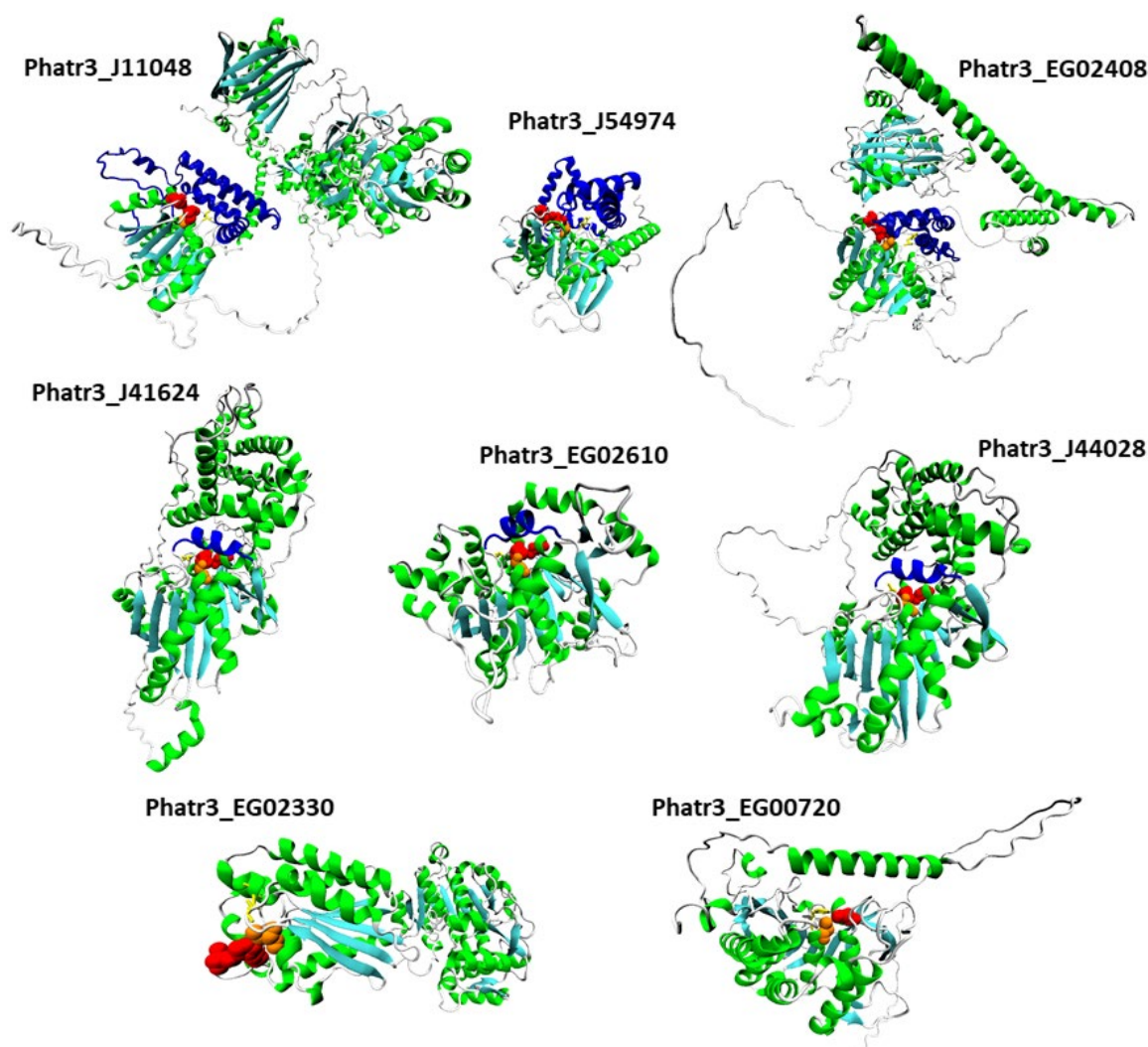


Figure 6. Tertiary structure models of the eight most regulated candidate lipases. Alpha helices are displayed in green while beta sheets are in cyan. Catalytic residues are displayed with a van der Waals representation in orange for the catalytic serines and red for other residues. Oxyanion hole residues are displayed with a licorice representation in yellow. Lids and caps are displayed in blue.

AlphaFold provides a confidence score for the models, the predicted local Distance Difference Test (pLDDT) that is an indicator of whether the structure should be trusted. For all structures, the average pLDDT is higher than 70 indicating good overall confidence in all the eight generated 3D models. However, the score is variable along the structure. Globally, the conserved domain parts are predicted with high confidence (80–90), confirming the observed folds. However, some structures such as that of Phatr3_EG02408 or that of Phatr3_J11048 include poorly predicted domains (<50), especially extended *N*-terminal strands and sequences separating two well-defined domains.

The quality of the structures was further evaluated by tracing Ramachandran diagrams that are a plot tracing the two torsional angles around the $C\alpha$ of each amino acid in a protein structure. Due to steric hindrance between side chains, not all angle values can be adopted and the diagram defines regions that are energetically favored, allowed or unlikely, termed respectively “highly favored”, “favored” and “questionable” in the Zlab server. This analysis conducted on the full predicted structures showed that four proteins had more than 90% of their amino acids in highly favored regions, while the four remaining only had between 80 and 90% of such residues and a high share (8.4 to 13.7%) of amino acid residues in a “questionable” position (Table S6). Removing the poorly predicted (according to

pIcDDT) extended strands from the models nearly suppressed amino acids in those regions, in agreement with pIcDDT score (Table S6). Two other metrics were calculated to further evaluate the quality of the structures (Figure 7). The Z-score is an indicator of how the total folding energy of the structure compares to the energy of a random arrangement of the atoms. Figure 7A shows that all models are within the range of experimentally determined protein structures of the same length, as expected for valid structures. Energy was also traced for each amino acids in the sequence (rolling average over 40 residues, Figure 7B) to investigate local model quality. As this metric is generally negative in native structures, positive values highlight poor quality parts of the 3D models [81]. As for pIcDDT scores, the domains showing positive value of energy are either *N*-terminal uncertain domains or linkage sequence between two well-predicted domains.

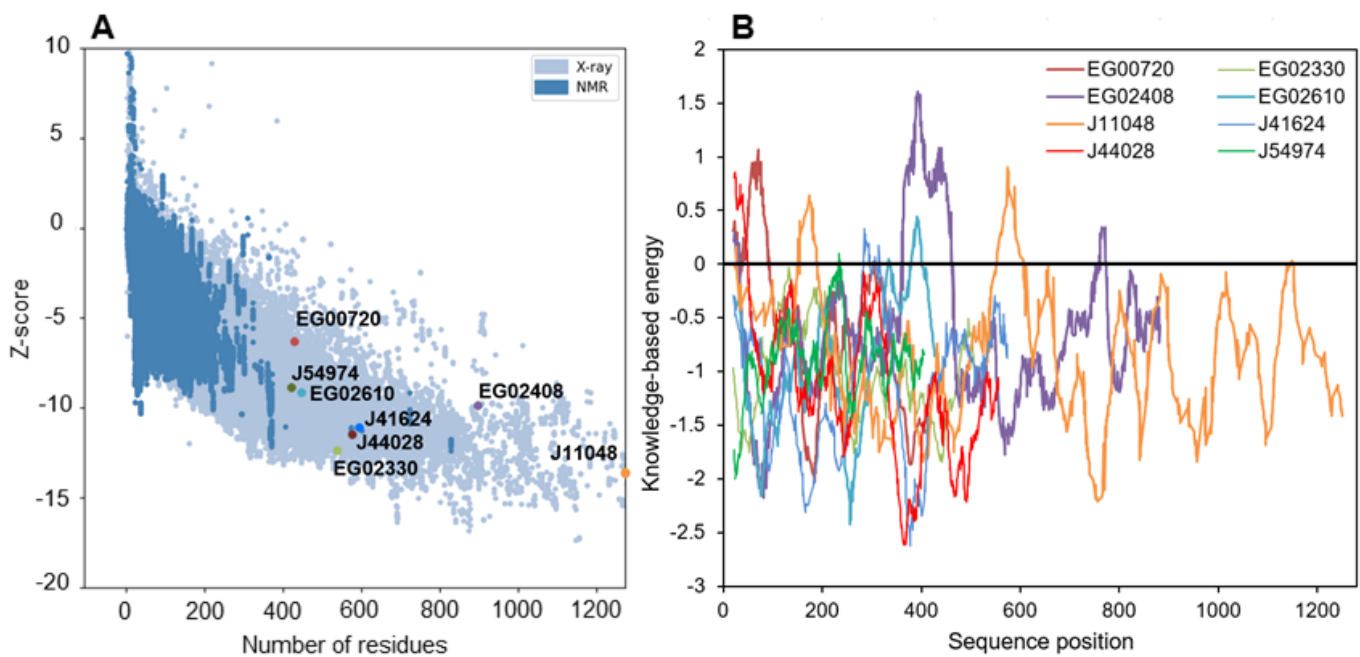


Figure 7. Energy characteristics for all the modelled structures as calculated by ProSa. (A): Z-score of structures as displayed within the range of experimentally determined structures, (B): knowledge-based energy plot averaged over 40 residues along the structures.

It is especially the case for the downregulated Phatr3_EG02408, which clearly displays two domains separated by a long poorly predicted sequence of approximately 300 amino acids (Figures 6 and 7B). The gene encoding this protein was created in the latest genome annotation of *P. tricornutum* by merging two genes (Phatr2_31407 and Phatr2_31408) from the previous annotation, a process carried out when two closely located genes are regulated similarly in transcriptomics data and encode protein domains often found together in other known-proteins [48]. The dataset by Matthijs et al. (2016) [77] was using the Phatr2 annotation and both genes showed different regulation levels, the Phatr2_31408 part being much more downregulated than the Phatr2_31407 one (at 8 hrs of nitrate starvation, a log₂ of -3.2 against -0.53). This variation in regulation for two parts of the same gene, along with the poorly predicted linkage sequence between the two protein domains highlight that this gene model is uncertain and should be further investigated. However, if this annotation is correct, the first domain would be the classic α/β fold, while the second one corresponds to a “polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport” superfamily domain. This second domain is present in a vast protein family including members that act in non-vesicular lipid transport through the binding of different lipid species including cholesterol and phosphatidyl-choline [82]. As it was predicted to be located in the plastid in our analysis, Phatr3_EG02408 could participate in lipid exchange between plastid membranes or between other organelles membranes and plastid membranes. Another α/β hydrolase,

Phatr3_J11048, also had different domains, including a C-terminal enolase domain, and a possible “polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport” domain. The presence of three different functional domains suggests a complex functioning for this protein that should be investigated by functional genomics and/or purification.

In addition to the α/β fold, it is common for lipases structures to include one or several additional domains that cover and control the access of substrates to the catalytic site [34]. By inspection of our 3D models, the three class 3 lipases were found to share a common structure above the catalytic site made of one helix (in blue in Figure 6). This helix could be a lid, a mobile domain that can take two conformations: one open that lets the substrate enter the active site, and one closed blocking it. Lids are crucial to the interfacial activation of lipases and allow a high activity when in contact with lipids [33], at the surface of lipid droplets for instance.

In our three α/β hydrolase models including the CGI-58 homolog (Phatr3_J54974), another type of structure made of five α helices was found above and around the catalytic site (Figure 6, Figure S1). These structures are possibly caps, a kind of domain that also covers the catalytic site like lids, but that are immobile and where the substrate passes through a tunnel to reach the active residues. Such a cap domain is also present in the human CGI-58 experimental structure [83]. Both the patatin-like lipase (Phatr3_EG00720) and the GDSL lipase (Phatr3_EG02330) have an active site directly accessible from the surface which could mean a different type of activity. Along with functions in plant growth and development, GDSL lipases are also known as regulators of plant response to stress [84]. Currently, no GDSL lipase from microalgae has been characterized, so their function in these organisms is unknown. As it is highly regulated under nitrogen starvation, the GDSL lipase Phatr3_EG02330 could be a driver of the response of diatoms to stress. Indeed, the predicted tertiary structure of this protein shows that the canonical GDSL domain is followed by a NADP-binding domain that could be involved in regulation mechanisms, as nutrient stress conditions induce an imbalance in redox status in the cell [69].

3. Materials and Methods

3.1. Steps for the Screening Procedure and Retrieval of Sequences

The latest *P. tricornutum* genome annotation is termed Phatr3 [48] and is available at the Ensembl portal (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum/Info/Index, accessed on 2 May 2022). The annotation was queried with the research terms “lipase” and “phospholipase”. Lipases are hydrolases with a α/β hydrolase domain, and some proteins annotated as such could be lipases, as is the case for the CGI-58 homolog Phatr3_J54974. Hence, the term “alpha/beta hydrolase” was also searched. Other proteins identified as lipases in previous studies were also included: a patatin-like phospholipase domain containing protein 3 (Phatr3_J46511) [85] and two phospholipase A proteins (Phatr3_J44005 and Phatr3_J44066) [27]. Full length amino acid sequences were then downloaded from Ensembl. Sequences were first submitted in the Pfam database (<http://pfam-legacy.xfam.org/>, accessed on 1 June 2022), and a threshold E-value of 10^{-5} was used to consider a hit as a significant annotation. Then, as lipases should include a GXSXG motif (excepting GDSL lipases), sequences not containing this motif were excluded from the dataset. Finally, as α/β hydrolases can have a range of hydrolytic activities (not necessarily toward lipids), proteins annotated as such were submitted to the ESTHER database (<https://bioweb.supagro.inrae.fr/ESTHER/general?what=index>, accessed on 1 June 2022). Enzymes for which the best hit was annotated with a precise function (i.e., proline iminopeptidase, pheophytinase . . .) other than lipase were excluded from the analysis.

3.2. Multiple Alignment of Sequences

Sequences from the identified proteins with a possible TAG lipase function were aligned using the software MAFFT (Multiple Alignment Program for Amino Acid or Nucleotide Sequences) with default parameters (MAFFT flavor auto, Gap extension penalty 0.123, Gap

opening penalty 1.53, No matrix) through the NG phylogeny platform (<https://ngphylogeny.fr/>, accessed on 3 June 2022).

3.3. Determination of Physico-Chemical Characteristics

Molecular weight, number of positively and negatively charged amino acids, extinction coefficient at 280 nm in water, isoelectric point, half-life of the protein, instability index, aliphatic index and Grand Average of Hydropathy (GRAVY) were obtained using the ProtParam tool available online at ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>, accessed on 24 August 2022).

3.4. Subcellular Localization Prediction and Post-Translational Modification

In order to predict the subcellular location of proteins, an adapted version of the pipeline proposed by Van Tol et Armbrurst (2021) [86] was used (Figure S2). The candidate sequences were used as inputs for TargetP 2.0 [87], SignalP 6.0 [88], SignalP 3.0 [89], HECTAR [90], ASAFind [91] and MitoprotII [92]. The ScanProsite tool (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>, accessed on 24 August 2022) was also run to search for a potential ER-retention signal [K/D]-[D/E]-E-L and for peroxisome targeting signal 1 and 2, respectively [S/A/C]-[K/R/H]-[L/M] and S-S-L, at the end of the C-terminus of the protein. Additionally, DeepTMHMM [93] was used to predict transmembrane domains. Seven possible locations can be predicted through this pipeline: cytosol, ER/cytosol, ER, chloroplast, mitochondria, mitochondria/peroxisome, and peroxisome. Potential sites for post-translational acylation and prenylation were predicted using GPS-Lipid [94] with the high stringency option. Vacuolar di-leucine targeting signals ([D/E]-XXXL-[L/I] or DXLL) were searched with ScanProsite.

3.5. Tertiary Structure Prediction and Quality Analysis

The translated amino acid sequence of the most regulated candidate proteins were used as inputs for tertiary structure prediction by AlphaFold2 through the Colabfold interface with the “template_mode” option set as pdb70 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>, accessed on 29 August 2022) [95]. AlphaFold2 is the first algorithm that predicts protein tertiary structure to a precision close to experimental models [96]. It is based on deep neural networks trained with structures available on the Protein Database (PDB). Briefly, the algorithm searches for homologues of the primary sequence in databases and generates a multiple sequence alignment (MSA). In the case of Colabfold, the database is a combination of BFD and MGnify databases expanded using metagenomics sequences from different environment and domains of life [95]. The primary sequence is also used to retrieve the 20 best structure templates in the PDB70, a clustered version of the PDB. Both MSA and templates found are used as input for the algorithm which predicts the 3D coordinates of amino acids backbones and residues. For refining the 3D architecture, the obtained structure is fed back into the algorithm 3 times (recycle count = 3). AlphaFold2 produces 5 models using different random seeds and the use or not of templates. The models are then compared using a predicted local Distance Difference Test (pLDDT) which is an assessment of the confidence one can have in the predicted structure. The model with the highest mean pLDDT is considered the best structure. For interpretation, a pLDDT > 70 is considered to be confident (90 being very confident), while under 50 the region should be considered as random or disorganized [96]. VMD 1.9.3 was used to visualize the structures and to highlight residues. Ramachandran plots were traced in Z-lab (<https://zlab.umassmed.edu/bu/rama/>, accessed on 30 August 2022). Energy scores of the structures were obtained using the Protein Structure Analysis-web tool (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>, accessed on 2 September 2022) [81] and data extracted using WebPlotDigitizer (<https://automeris.io/WebPlotDigitizer/>, accessed on 2 September 2022).

4. Conclusions

The aim of this study was to use an *in silico* approach to identify relevant enzymes playing roles in the lipid catabolism in *P. tricornutum*. Our screening approach yielded 57 candidate lipases in 4 families: α/β hydrolases, class 3 lipases, patatin-like phospholipases and GDSL lipases. Further *in silico* investigations of these putative enzymes highlighted 8 highly regulated enzymes that could hence be active in lipid metabolism response to a nitrogen availability shift, and four others (Phatr3_J46193, Phatr3_J47614, Phatr3_J45660 and Phatr3_J15323) that were less regulated but showed interesting features in their predicted subcellular localization.

General characterization of the set of enzymes revealed that a majority of them was hydrophilic and located to the cytosol, suggesting that they could temporarily be associated with LDs from the cytosol in a process of lipolysis. Three enzymes, Phatr3_J15323, Phatr3_J41624 and Phatr3_J45660 were predicted to possibly be vacuolar, suggesting they could act in lipophagy, the second hypothesized pathway for lipid degradation in diatoms. The respective contribution of those two mechanisms to lipid catabolism in diatoms is not known and could be investigated using inhibitors of lipase activity and of autophagy.

Transcription patterns highlighted that candidate lipases could be regulated in both directions (up and down) as a response to nitrogen stress. Enzymes that are downregulated during lipid accumulation are promising candidates for a TAG lipase activity. The most downregulated lipase is the CGI-58 homolog Phatr3_J54974 which inactivation has already been shown to enhance TAG accumulation and could hence be a major lipolysis actor. Two other proteins were highly downregulated and could hence be relevant actors in the lipolysis process: the α/β hydrolase Phatr3_EG02408, and the patatin-like Phatr3_EG00720 which transmembrane helix could permit to translocate from the ER to LDs. The 3D modelling showed that all three candidates had well-predicted lipase structures while Phatr3_EG02408 was possibly made of two distinct proteins.

Further work should then use Phatr3_J54974 and Phatr3_EG00720 as targets for over-expression, knockdown or knockout in order to investigate mechanisms of lipolysis and to improve lipid production. Purification should also be conducted to characterize their activity on various lipidic substrates and search for new enzymatic activities of biotechnological interest.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/md21020125/s1>, Figure S1: Alternative view of the cap domain (blue) of the CGI-58 homolog Phatr3_J54974 that surround the catalytic site; Figure S2: Pipeline used for the prediction of subcellular localization; Table S1: List of retrieved sequences through a search in the genome annotation of *Phaeodactylum tricornutum* Phatr3 (Rastogi et al. 2018) and screening through the pfam and ESTHER databases; Table S2: Protparam complete results obtained from the ExPasy server; Table S3: Sub-cellular prediction for putative lipase localization; Table S4: Prediction of prenylation and acylation sites by GPS lipids; Table S5: Complete transcription data for the 57 lipases identified in this study; Table S6: Ramachandran analysis results as obtained from the Z-lab server.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.; methodology, V.M.; validation, V.M., J.H. and J.M.; formal analysis, V.M.; investigation, V.M.; writing—original draft preparation, V.M.; writing—review and editing, V.M., L.U., J.H., J.M. and B.S.; supervision, L.U., J.H. and J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Victor Murison was a recipient of a PhD fellowship from the Collectivités Locales Mayennaises.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original data presented in the study are included in the article/Supplementary Materials; further inquiries can be directed to the corresponding author.

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

References

1. Schoefs, B.; Van de Vijver, B.; Wetzel, C.E.; Ector, L. Introduction: From Diatom Species Identification to Ecological and Biotechnological Applications. *Bot. Lett.* **2020**, *167*, 2–6. [[CrossRef](#)]
2. Bertrand, J.; Coste, C.; Le Cohu, R.; Renon, J.-P.; Ector, L. Étude préliminaire sur la présence de diatomées sur les lichens. *Bot. Lett.* **2016**, *163*, 93–115. [[CrossRef](#)]
3. Nelson, D.M.; Tréguer, P.; Brzezinski, M.A.; Leynaert, A.; Quéguiner, B. Production and Dissolution of Biogenic Silica in the Ocean: Revised Global Estimates, Comparison with Regional Data and Relationship to Biogenic Sedimentation. *Glob. Biogeochem. Cycles* **1995**, *9*, 359–372. [[CrossRef](#)]
4. Field, C.B.; Behrenfeld, M.J.; Randerson, J.T.; Falkowski, P.G. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* **1998**, *281*, 237–240. [[CrossRef](#)]
5. Wagner, H.; Jakob, T.; Fanesi, A.; Wilhelm, C. Towards an Understanding of the Molecular Regulation of Carbon Allocation in Diatoms: The Interaction of Energy and Carbon Allocation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, *372*, 20160410. [[CrossRef](#)]
6. Sayanova, O.; Mimouni, V.; Ulmann, L.; Morant, A.; Pasquet, V.; Schoefs, B.; Napier, J.A. Modulation of Lipid Biosynthesis by Stress in Diatoms. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, *372*, 20160407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Matsumoto, M.; Mayama, S.; Nemoto, M.; Fukuda, Y.; Muto, M.; Yoshino, T.; Matsunaga, T.; Tanaka, T. Morphological and Molecular Phylogenetic Analysis of the High Triglyceride-Producing Marine Diatom, *Fistulifera Solaris* Sp. Nov. (Bacillariophyceae): *Fistulifera Solaris* Sp. Nov. *Phycol. Res.* **2014**, *62*, 257–268. [[CrossRef](#)]
8. Chisti, Y. Biodiesel from Microalgae. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 294–306. [[CrossRef](#)]
9. Ulmann, L.; Blanckaert, V.; Mimouni, V.; Andersson, M.X.; Schoefs, B.; Chenais, B. Microalgal Fatty Acids and Their Implication in Health and Disease. *Mini Rev. Med. Chem.* **2017**, *17*, 1112–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Leyland, B.; Zarka, A.; Didi-Cohen, S.; Boussiba, S.; Khozin-Goldberg, I. High Resolution Proteome of Lipid Droplets Isolated from the Pennate Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* (Bacillariophyceae) Strain Pt4 Provides Mechanistic Insights into Complex Intracellular Coordination during Nitrogen Deprivation. *J. Phycol.* **2020**, *56*, 1642–1663. [[CrossRef](#)]
11. Lupette, J.; Jaussaud, A.; Seddiki, K.; Morabito, C.; Brugière, S.; Schaller, H.; Kuntz, M.; Putaux, J.-L.; Jouneau, P.-H.; Rébeillé, F.; et al. The Architecture of Lipid Droplets in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Algal Res.* **2019**, *38*, 101415. [[CrossRef](#)]
12. Huang, B.; Marchand, J.; Blanckaert, V.; Lukomska, E.; Ulmann, L.; Wielgosz-Collin, G.; Rabesaotra, V.; Moreau, B.; Bougaran, G.; Mimouni, V.; et al. Nitrogen and Phosphorus Limitations Induce Carbon Partitioning and Membrane Lipid Remodelling in the Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Eur. J. Phycol.* **2019**, *54*, 342–358. [[CrossRef](#)]
13. Alipanah, L.; Winge, P.; Rohloff, J.; Najafi, J.; Brembu, T.; Bones, A.M. Molecular Adaptations to Phosphorus Deprivation and Comparison with Nitrogen Deprivation Responses in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mus, F.; Toussaint, J.-P.; Cooksey, K.E.; Fields, M.W.; Gerlach, R.; Peyton, B.M.; Carlson, R.P. Physiological and Molecular Analysis of Carbon Source Supplementation and PH Stress-Induced Lipid Accumulation in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 3625–3642. [[CrossRef](#)]
15. Nunez, M.; Quigg, A. Changes in Growth and Composition of the Marine Microalgae *Phaeodactylum Tricornutum* and *Nannochloropsis Salina* in Response to Changing Sodium Bicarbonate Concentrations. *J. Appl. Phycol.* **2016**, *28*, 2123–2138. [[CrossRef](#)]
16. Sharma, N.; Fleurent, G.; Awwad, F.; Cheng, M.; Meddeb-Mouelhi, F.; Budge, S.M.; Germain, H.; Desgagné-Penix, I. Red Light Variation an Effective Alternative to Regulate Biomass and Lipid Profiles in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 2531. [[CrossRef](#)]
17. Duarte, B.; Feijão, E.; Goessling, J.W.; Caçador, I.; Matos, A.R. Pigment and Fatty Acid Production under Different Light Qualities in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 2550. [[CrossRef](#)]
18. Dinamarca, J.; Levitan, O.; Kumaraswamy, G.K.; Lun, D.S.; Falkowski, P.G. Overexpression of a Diacylglycerol Acyltransferase Gene in *Phaeodactylum Tricornutum* Directs Carbon towards Lipid Biosynthesis. *J. Phycol.* **2017**, *53*, 405–414. [[CrossRef](#)]
19. Haslam, R.P.; Hamilton, M.L.; Economou, C.K.; Smith, R.; Hassall, K.L.; Napier, J.A.; Sayanova, O. Overexpression of an Endogenous Type 2 Diacylglycerol Acyltransferase in the Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* Enhances Lipid Production and Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Content. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, *13*, 87. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, Y.; Pan, Y.; Ding, W.; Hu, H.; Liu, J. Lipid Production Is More than Doubled by Manipulating a Diacylglycerol Acyltransferase in Algae. *GCB Bioenergy* **2021**, *13*, 185–200. [[CrossRef](#)]
21. Zhu, B.-H.; Tu, C.-C.; Shi, H.-P.; Yang, G.-P.; Pan, K.-H. Overexpression of Endogenous Delta-6 Fatty Acid Desaturase Gene Enhances Eicosapentaenoic Acid Accumulation in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Process Biochem.* **2017**, *57*, 43–49. [[CrossRef](#)]
22. Wang, X.; Dong, H.-P.; Wei, W.; Balamurugan, S.; Yang, W.-D.; Liu, J.-S.; Li, H.-Y. Dual Expression of Plastidial GPAT1 and LPAT1 Regulates Triacylglycerol Production and the Fatty Acid Profile in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wang, X.; Liu, S.-F.; Li, R.-Y.; Yang, W.-D.; Liu, J.-S.; Lin, C.S.K.; Balamurugan, S.; Li, H.-Y. TAG Pathway Engineering via GPAT2 Concurrently Potentiates Abiotic Stress Tolerance and Oleaginity in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, *13*, 160. [[CrossRef](#)]
24. Xue, J.; Niu, Y.-F.; Huang, T.; Yang, W.-D.; Liu, J.-S.; Li, H.-Y. Genetic Improvement of the Microalga *Phaeodactylum Tricornutum* for Boosting Neutral Lipid Accumulation. *Metab. Eng.* **2015**, *27*, 1–9. [[CrossRef](#)]

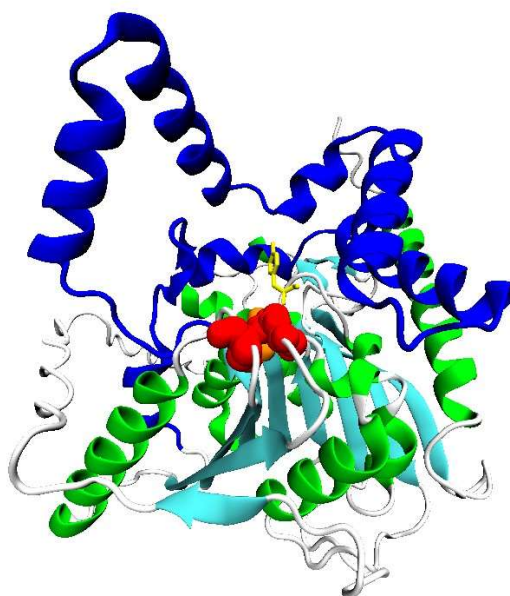
25. Zhu, B.-H.; Zhang, R.-H.; Lv, N.-N.; Yang, G.-P.; Wang, Y.-S.; Pan, K.-H. The Role of Malic Enzyme on Promoting Total Lipid and Fatty Acid Production in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 826. [[CrossRef](#)]
26. Zhang, R.; Zhu, B.; Tu, C.; Li, Y.; Zhao, Y.; Pan, K. The Combined Effect of Nitrogen Deprivation and Overexpression of Malic Enzyme Gene on Growth and Lipid Accumulation in *Phaeodactylum Tricornutum*. *J. Appl. Phycol.* **2021**, *33*, 3637–3645. [[CrossRef](#)]
27. Conte, M.; Lupette, J.; Seddiki, K.; Meï, C.; Dolch, L.-J.; Gros, V.; Barette, C.; Rébeillé, F.; Jouhet, J.; Maréchal, E. Screening for Biologically Annotated Drugs That Trigger Triacylglycerol Accumulation in the Diatom *Phaeodactylum*. *Plant Physiol.* **2018**, *177*, 532–552. [[CrossRef](#)]
28. Zhu, B.-H.; Shi, H.-P.; Yang, G.-P.; Lv, N.-N.; Yang, M.; Pan, K.-H. Silencing UDP-Glucose Pyrophosphorylase Gene in *Phaeodactylum Tricornutum* Affects Carbon Allocation. *New Biotechnol.* **2016**, *33*, 237–244. [[CrossRef](#)]
29. Daboussi, F.; Leduc, S.; Maréchal, A.; Dubois, G.; Guyot, V.; Perez-Michaut, C.; Amato, A.; Falciatore, A.; Juillerat, A.; Beurdeley, M.; et al. Genome Engineering Empowers the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* for Biotechnology. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3831. [[CrossRef](#)]
30. Barka, F.; Angstenberger, M.; Ahrendt, T.; Lorenzen, W.; Bode, H.B.; Büchel, C. Identification of a Triacylglycerol Lipase in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Biol. Lipids* **2016**, *1861*, 239–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Zienkiewicz, K.; Zienkiewicz, A. Degradation of Lipid Droplets in Plants and Algae—Right Time, Many Paths, One Goal. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 579019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kong, F.; Romero, I.T.; Warakanont, J.; Li-Beisson, Y. Lipid Catabolism in Microalgae. *New Phytol.* **2018**, *218*, 1340–1348. [[CrossRef](#)]
33. Casas-Godoy, L.; Gasteazoro, F.; Duquesne, S.; Bordes, F.; Marty, A.; Sandoval, G. Lipases: An Overview. In *Lipases and Phospholipases*; Sandoval, G., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, USA, 2018; Volume 1835, pp. 3–38. ISBN 978-1-4939-8671-2.
34. Bauer, T.L.; Buchholz, P.C.F.; Pleiss, J. The Modular Structure of α /B-hydrolases. *FEBS J.* **2020**, *287*, 1035–1053. [[CrossRef](#)]
35. Eastmond, P.J. SUGAR-DEPENDENT1 Encodes a Patatin Domain Triacylglycerol Lipase That Initiates Storage Oil Breakdown in Germinating *Arabidopsis* Seeds. *Plant Cell* **2006**, *18*, 665–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zimmermann, R.; Strauss, J.G.; Haemmerle, G.; Schoiswohl, G.; Birner-Gruenberger, R.; Riederer, M.; Lass, A.; Neuberger, G.; Eisenhaber, F.; Hermetter, A.; et al. Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science* **2004**, *306*, 1383–1386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bielen, A.; Četković, H.; Long, P.F.; Schwab, H.; Abramić, M.; Vujaklija, D. The SGNH-Hydrolase of *Streptomyces Coelicolor* Has (Aryl)Esterase and a True Lipase Activity. *Biochimie* **2009**, *91*, 390–400. [[CrossRef](#)]
38. Akoh, C.C.; Lee, G.-C.; Liaw, Y.-C.; Huang, T.-H.; Shaw, J.-F. GDSL Family of Serine Esterases/Lipases. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 534–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Li, X.; Pan, Y.; Hu, H. Identification of the Triacylglycerol Lipase in the Chloroplast Envelope of the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Algal Res.* **2018**, *33*, 440–447. [[CrossRef](#)]
40. Calleja, P.; Leterrier, M.; Maréchal, E. Modified Algae Strain and Method of Triacylglycerol Accumulation Using Said Strain. U.S. Patent 9,938,545, 10 April 2018.
41. Shu, Q.; Pan, Y.; Hu, H. CGI-58 Protein Acts as a Positive Regulator of Triacylglycerol Accumulation in *Phaeodactylum Tricornutum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2023**, *33*, 1–9. [[CrossRef](#)]
42. Trentacoste, E.M.; Shrestha, R.P.; Smith, S.R.; Gle, C.; Hartmann, A.C.; Hildebrand, M.; Gerwick, W.H. Metabolic Engineering of Lipid Catabolism Increases Microalgal Lipid Accumulation without Compromising Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19748–19753. [[CrossRef](#)]
43. Maeda, Y.; Watanabe, K.; Kaha, M.; Yabu, Y.; Yoshino, T.; Matsumoto, M.; Tanaka, T. Assessment on the Oil Accumulation by Knockdown of Triacylglycerol Lipase in the Oleaginous Diatom *Fistulifera Solaris*. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20905. [[CrossRef](#)]
44. Chandra, P.; Enespa; Singh, R.; Arora, P.K. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: A Comprehensive Review. *Microb. Cell Factories* **2020**, *19*, 42. [[CrossRef](#)]
45. Siegler, H.; Valerius, O.; Ischebeck, T.; Popko, J.; Tourasse, N.J.; Vallon, O.; Khozin-Goldberg, I.; Braus, G.H.; Feussner, I. Analysis of the Lipid Body Proteome of the Oleaginous Alga *Lobosphaera Incisa*. *BMC Plant Biol.* **2017**, *17*, 98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Li, X.; Benning, C.; Kuo, M.-H. Rapid Triacylglycerol Turnover in *Chlamydomonas Reinhardtii* Requires a Lipase with Broad Substrate Specificity. *Eukaryot. Cell* **2012**, *11*, 1451–1462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tsai, C.-H.; Uygun, S.; Roston, R.; Shiu, S.-H.; Benning, C. Recovery from N Deprivation Is a Transcriptionally and Functionally Distinct State in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **2018**, *176*, 2007–2023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Rastogi, A.; Maheswari, U.; Dorrell, R.G.; Vieira, F.R.J.; Maumus, F.; Kustka, A.; McCarthy, J.; Allen, A.E.; Kersey, P.; Bowler, C.; et al. Integrative Analysis of Large Scale Transcriptome Data Draws a Comprehensive Landscape of *Phaeodactylum Tricornutum* Genome and Evolutionary Origin of Diatoms. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4834. [[CrossRef](#)]
49. Rydel, T.J.; Williams, J.M.; Krieger, E.; Moshiri, F.; Stallings, W.C.; Brown, S.M.; Pershing, J.C.; Purcell, J.P.; Alibhai, M.F. The Crystal Structure, Mutagenesis, and Activity Studies Reveal That Patatin Is a Lipid Acyl Hydrolase with a Ser-Asp Catalytic Dyad. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6696–6708. [[CrossRef](#)]
50. Kumari, A.; Gupta, R. Phenylalanine to Leucine Point Mutation in Oxyanion Hole Improved Catalytic Efficiency of Lip12 from *Yarrowia Lipolytica*. *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *53*, 386–390. [[CrossRef](#)]

51. Ben Hlima, H.; Dammak, M.; Karray, A.; Drira, M.; Michaud, P.; Fendri, I.; Abdelkafi, S. Molecular and Structural Characterizations of Lipases from *Chlorella* by Functional Genomics. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 70. [[CrossRef](#)]
52. Nomaguchi, T.; Maeda, Y.; Liang, Y.; Yoshino, T.; Asahi, T.; Tanaka, T. Comprehensive Analysis of Triacylglycerol Lipases in the Oleaginous Diatom *Fistulifera Solaris* JPC DA0580 with Transcriptomics under Lipid Degradation. *J. Biosci. Bioeng.* **2018**, *126*, 258–265. [[CrossRef](#)]
53. Holmes, R. Comparative Studies of Adipose Triglyceride Lipase Genes and Proteins: An Ancient Gene in Vertebrate Evolution. *Open Access Bioinform.* **2012**, *15*, 1–15. [[CrossRef](#)]
54. Pleiss, J.; Fischer, M.; Peiker, M.; Thiele, C.; Schmid, R.D. Lipase Engineering Database Understanding and Exploiting Sequence–Structure–Function Relationships. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2000**, *10*, 491–508. [[CrossRef](#)]
55. Abida, H.; Dolch, L.-J.; Meï, C.; Villanova, V.; Conte, M.; Block, M.A.; Finazzi, G.; Bastien, O.; Tirichine, L.; Bowler, C.; et al. Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 118–136. [[CrossRef](#)]
56. Nobusawa, T.; Yamakawa-Ayukawa, K.; Saito, F.; Nomura, S.; Takami, A.; Ohta, H. A Homolog of Arabidopsis SDP1 Lipase in Nannochloropsis Is Involved in Degradation of de Novo-Synthesized Triacylglycerols in the Endoplasmic Reticulum. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Biol. Lipids* **2019**, *1864*, 1185–1193. [[CrossRef](#)]
57. Yang, Z.-K.; Ma, Y.-H.; Zheng, J.-W.; Yang, W.-D.; Liu, J.-S.; Li, H.-Y. Proteomics to Reveal Metabolic Network Shifts towards Lipid Accumulation Following Nitrogen Deprivation in the Diatom. *J. Appl. Phycol.* **2014**, *26*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Kiraga, J.; Mackiewicz, P.; Mackiewicz, D.; Kowalczyk, M. The Relationships between the Isoelectric Point and: Length of Proteins, Taxonomy and Ecology of Organisms. *BMC Genom.* **2007**, *8*, 16. [[CrossRef](#)]
59. Ikai, A. Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. *J. Biochem.* **1980**, *88*, 1895–1898. [[CrossRef](#)]
60. Guruprasad, K.; Reddy, B.V.B.; Pandit, M.W. Correlation between Stability of a Protein and Its Dipeptide Composition: A Novel Approach for Predicting in Vivo Stability of a Protein from Its Primary Sequence. *Protein Eng.* **1990**, *4*, 155–161. [[CrossRef](#)]
61. Gamage, D.G.; Gunaratne, A.; Periyannan, G.R.; Russell, T.G. Applicability of Instability Index for In Vitro Protein Stability Prediction. *Protein Pept. Lett.* **2019**, *26*, 339–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Li, J.; Cai, Z.; Vaites, L.P.; Shen, N.; Mitchell, D.C.; Huttlin, E.L.; Paulo, J.A.; Harry, B.L.; Gygi, S.P. Proteome-Wide Mapping of Short-Lived Proteins in Human Cells. *Mol. Cell* **2021**, *81*, 4722–4735.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kyte, J.; Doolittle, R.F. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Olzmann, J.A.; Carvalho, P. Dynamics and Functions of Lipid Droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 137–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wang, X.; Wei, H.; Mao, X.; Liu, J. Proteomics Analysis of Lipid Droplets from the Oleaginous Alga *Chromochloris Zofingiensis* Reveals Novel Proteins for Lipid Metabolism. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2019**, *17*, 260–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Yoneda, K.; Yoshida, M.; Suzuki, I.; Watanabe, M.M. Identification of a Major Lipid Droplet Protein in a Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 397–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Wang, X.; Hao, T.-B.; Balamurugan, S.; Yang, W.-D.; Liu, J.-S.; Dong, H.-P.; Li, H.-Y. A Lipid Droplet-Associated Protein Involved in Lipid Droplet Biogenesis and Triacylglycerol Accumulation in the Oleaginous Microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *Algal Res.* **2017**, *26*, 215–224. [[CrossRef](#)]
68. Thazar-Poulot, N.; Miquel, M.; Fobis-Loisy, I.; Gaude, T. Peroxisome Extensions Deliver the *Arabidopsis* SDP1 Lipase to Oil Bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 4158–4163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Leyland, B.; Boussiba, S.; Khozin-Goldberg, I. A Review of Diatom Lipid Droplets. *Biology* **2020**, *9*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Hemsley, P.A.; Grierson, C.S. Multiple Roles for Protein Palmitoylation in Plants. *Trends Plant Sci.* **2008**, *13*, 295–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Schwarz, V.; Andosch, A.; Geretschläger, A.; Affenzeller, M.; Lütz-Meindl, U. Carbon Starvation Induces Lipid Degradation via Autophagy in the Model Alga *Microcystis*. *J. Plant Physiol.* **2017**, *208*, 115–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Hayashi, Y.; Sato, N.; Shinozaki, A.; Watanabe, M. Increase in Peroxisome Number and the Gene Expression of Putative Glyoxysomal Enzymes in *Chlamydomonas* Cells Supplemented with Acetate. *J. Plant Res.* **2015**, *128*, 177–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Jallet, D.; Xing, D.; Hughes, A.; Moosburner, M.; Simmons, M.P.; Allen, A.E.; Peers, G. Mitochondrial Fatty Acid β -oxidation Is Required for Storage-lipid Catabolism in a Marine Diatom. *New Phytol.* **2020**, *228*, 946–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Schreiber, V.; Dersch, J.; Puzik, K.; Bäcker, O.; Liu, X.; Stork, S.; Schulz, J.; Heimerl, T.; Klingl, A.; Zauner, S.; et al. The Central Vacuole of the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*: Identification of New Vacuolar Membrane Proteins and of a Functional Di-Leucine-Based Targeting Motif. *Protist* **2017**, *168*, 271–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Scarsini, M.; Thiriet-Rupert, S.; Veidl, B.; Mondeguer, F.; Hu, H.; Marchand, J.; Schoefs, B. The Transition Toward Nitrogen Deprivation in Diatoms Requires Chloroplast Stand-By and Deep Metabolic Reshuffling. *Front. Plant Sci.* **2022**, *12*, 760516. [[CrossRef](#)]
76. Alipanah, L.; Rohloff, J.; Winge, P.; Bones, A.M.; Brembu, T. Whole-Cell Response to Nitrogen Deprivation in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 6281–6296. [[CrossRef](#)]

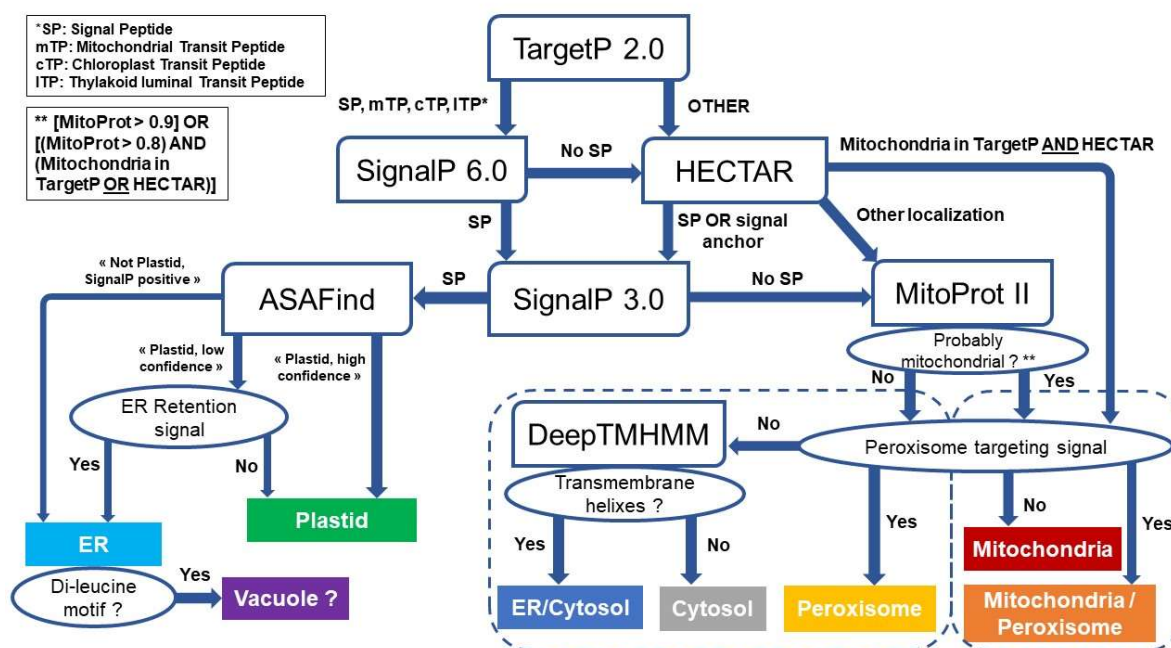
77. Matthijs, M.; Fabris, M.; Broos, S.; Vyverman, W.; Goossens, A. Profiling of the Early Nitrogen Stress Response in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* Reveals a Novel Family of RING-Domain Transcription Factors. *Plant Physiol.* **2016**, *170*, 489–498. [[CrossRef](#)]
78. Adelfi, M.G.; Vitale, R.M.; d'Ippolito, G.; Nuzzo, G.; Gallo, C.; Amodeo, P.; Manzo, E.; Pagano, D.; Landi, S.; Picariello, G.; et al. Patatin-like Lipolytic Acyl Hydrolases and Galactolipid Metabolism in Marine Diatoms of the Genus Pseudo-Nitzschia. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Biol. Lipids* **2019**, *1864*, 181–190. [[CrossRef](#)]
79. Heydarizadeh, P.; Veidl, B.; Huang, B.; Lukomska, E.; Wielgosz-Collin, G.; Couzinet-Mossion, A.; Bougaran, G.; Marchand, J.; Schoefs, B. Carbon Orientation in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*: The Effects of Carbon Limitation and Photon Flux Density. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 471. [[CrossRef](#)]
80. Chepyshko, H.; Lai, C.-P.; Huang, L.-M.; Liu, J.-H.; Shaw, J.-F. Multifunctionality and Diversity of GDSL Esterase/Lipase Gene Family in Rice (*Oryza Sativa* L. *Japonica*) Genome: New Insights from Bioinformatics Analysis. *BMC Genom.* **2012**, *13*, 309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Wiederstein, M.; Sippl, M.J. ProSA-Web: Interactive Web Service for the Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W407–W410. [[CrossRef](#)]
82. Iyer, L.M.; Koonin, E.V.; Aravind, L. Adaptations of the Helix-Grip Fold for Ligand Binding and Catalysis in the START Domain Superfamily. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2001**, *43*, 134–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Oberer, M.; Boeszoermenyi, A.; Nagy, H.M.; Zechner, R. Recent Insights into the Structure and Function of Comparative Gene Identification-58. *Curr. Opin. Lipidol.* **2011**, *22*, 149–158. [[CrossRef](#)]
84. Ding, L.-N.; Li, M.; Wang, W.-J.; Cao, J.; Wang, Z.; Zhu, K.-M.; Yang, Y.-H.; Li, Y.-L.; Tan, X.-L. Advances in Plant GDSL Lipases: From Sequences to Functional Mechanisms. *Acta Physiol. Plant.* **2019**, *41*, 151. [[CrossRef](#)]
85. Wang, X.; Liu, Y.-H.; Hu, D.-X.; Balamurugan, S.; Lu, Y.; Yang, W.-D.; Liu, J.-S.; Li, H.-Y. Identification of a Putative Patatin-like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 (PNPLA3) Ortholog Involved in Lipid Metabolism in Microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *Algal Res.* **2015**, *12*, 274–279. [[CrossRef](#)]
86. Van Tol, H.M.; Armbrust, E.V. Genome-Scale Metabolic Model of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana* Highlights the Importance of Nitrogen and Sulfur Metabolism in Redox Balance. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0241960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Almagro Armenteros, J.J.; Salvatore, M.; Emanuelsson, O.; Winther, O.; von Heijne, G.; Elofsson, A.; Nielsen, H. Detecting Sequence Signals in Targeting Peptides Using Deep Learning. *Life Sci. Alliance* **2019**, *2*, e201900429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Teufel, F.; Almagro Armenteros, J.J.; Johansen, A.R.; Gislason, M.H.; Pihl, S.I.; Tsirigos, K.D.; Winther, O.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 6.0 Predicts All Five Types of Signal Peptides Using Protein Language Models. *Nat. Biotechnol.* **2022**, *40*, 1023–1025. [[CrossRef](#)]
89. Dyrlov Bendtsen, J.; Nielsen, H.; von Heijne, G.; Brunak, S. Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*, 783–795. [[CrossRef](#)]
90. Gschloessl, B.; Guermeur, Y.; Cock, J.M. HECTAR: A Method to Predict Subcellular Targeting in Heterokonts. *BMC Bioinform.* **2008**, *9*, 393. [[CrossRef](#)]
91. Gruber, A.; Roca, G.; Kroth, P.G.; Armbrust, E.V.; Mock, T. Plastid Proteome Prediction for Diatoms and Other Algae with Secondary Plastids of the Red Lineage. *Plant J.* **2015**, *81*, 519–528. [[CrossRef](#)]
92. Claros, M.G.; Vincens, P. Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and Their Targeting Sequences. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *241*, 779–786. [[CrossRef](#)]
93. Hallgren, J.; Tsirigos, K.D.; Pedersen, M.D.; Almagro Armenteros, J.J.; Marcatili, P.; Nielsen, H.; Krogh, A.; Winther, O. DeepTMHMM Predicts Alpha and Beta Transmembrane Proteins Using Deep Neural Networks. *bioRxiv* **2022**. [[CrossRef](#)]
94. Xie, Y.; Zheng, Y.; Li, H.; Luo, X.; He, Z.; Cao, S.; Shi, Y.; Zhao, Q.; Xue, Y.; Zuo, Z.; et al. GPS-Lipid: A Robust Tool for the Prediction of Multiple Lipid Modification Sites. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28249. [[CrossRef](#)]
95. Mirdita, M.; Schütze, K.; Moriawaki, Y.; Heo, L.; Ovchinnikov, S.; Steinegger, M. ColabFold: Making Protein Folding Accessible to All. *Nat. Methods* **2022**, *19*, 679–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

2.3 – Matériel supplémentaire



Supplementary Figure S1: Alternative view of the cap domain (blue) of the CGI-58 homolog Phatr3_J54974 that surround the catalytic site.



Supplementary Figure S2: Pipeline used for the prediction of subcellular localization.

Les tableaux supplémentaires S1 à S6 sont disponibles en téléchargement à l'adresse suivante : <https://www.mdpi.com/article/10.3390/md21020125/s1>.

**3 – Voies métaboliques des lipides neutres et de la chrysolaminarine pendant
une carence en azote suivie d'une récupération cellulaire chez la diatomée
*Phaeodactylum tricornutum***

3.1 – Contexte et principaux résultats

Les résultats obtenus dans l'article 1 ont permis de décrire les variations des LD et du plaste en réponse à une carence en azote suivie d'une resupplémentation. Dans une optique de description des voies de dégradation des lipides, les résultats de l'article 2 ont identifié un ensemble de lipases potentiellement responsable des réponses à une variation de l'azote dans le milieu. L'objectif de l'article 3 est de compléter ces observations par un suivi de différents paramètres biochimiques (protéines solubles, glucides solubles, lipides totaux et neutres, pigments, contenus en azote et carbone) associé à un suivi de l'expression des gènes principaux du métabolisme des triglycérides et de la chrysolaminarine, les deux molécules de réserve présentes chez *P. tricornutum*. Une étude comparative est faite sur les écotypes Pt1 et Pt4.

Pour le métabolisme des triglycérides, les voies de synthèse ont déjà été explorées par de nombreuses études (voir **partie I-2.2**). Dans cette expérience, nous avons sélectionné les 15 acyltransférases de la voie de Kennedy ainsi que les 2 gènes possibles de PDAT présents chez *P. tricornutum*. La dégradation a été suivie par l'expression de 9 lipases identifiées dans l'article 2. Pour compléter ces voies, nous avons également quantifié les transcrits des deux protéines majeures de LD de *P. tricornutum* : la StLDP et la PtLDP1.

Les voies métaboliques de la chrysolaminarine chez *P. tricornutum* sont moins bien caractérisées, mais ont été précédemment reconstruites à partir des gènes identifiés par homologie dans le génome (Chen et al., 2021; Scarsini et al., 2022). Les voies de synthèse convertissent le glucose-6-phosphate en UDP-glucose par une UDP-glucose pyrophosphorylase (UGP). Les UDP-glucoses sont assemblés pour former un β -1,3 glucane linéaire par la β -1,3-glucan synthase (BGS). Ensuite, la chrysolaminarine est produite par l'ajout de ramifications en β -1,6 par une β -1,6-transglycosylase (TGS). L'expression d'une sélection de gènes associés aux différentes étapes (2 UGP, 1 BGS et 1TGS) a permis de suivre ces voies. La dégradation de la chrysolaminarine pourrait ensuite être réalisée par les endo et exo- β -glucosidases potentielles (EndoG et ExoG), dont nous avons mesuré l'expression de 3 et 5 gènes, respectivement.

Les résultats ont mis en évidence une réponse séquentielle des glucides solubles (chrysolaminarine) et des lipides neutres (TG) en carence en azote comme après resupplémentation. Ainsi, les glucides solubles sont stockés en premier et sont également consommés rapidement, dès 12 heures après resupplémentation. Suite à la consommation des glucides, nous avons observé une augmentation des taux par cellule de protéines et de chlorophylle, molécules contenant de l'azote. Ceci suggère que les glucides fournissent de l'énergie pour la capture et l'incorporation de l'azote, mais aussi la synthèse protéique et la

remise en place de l'appareil photosynthétique. Les lipides neutres sont accumulés plus progressivement et consommés entre 24 et 72 heures après resupplémentation. Les lipides ne sont ainsi consommés qu'au moment de la reprise de la croissance de la culture et pourraient ainsi fournir l'énergie nécessaire à la reprise du cycle cellulaire.

L'examen des transcrits a permis d'identifier certains gènes dont l'expression est en accord avec l'évolution des paramètres biochimiques pendant l'expérience : l'acide lysophosphatidique acyltransférase Phatr3_J45551 (LPAAT5) pour la synthèse des lipides, les lipases Phatr3_EG02408 (ABlip2) et Phatr3_EG00720 (PLPlip1) pour la dégradation des lipides, et les glucosidases Phatr3_J43302 (ExoG5) et Phatr3_J52685 (EndoG3) pour la dégradation des glucides. Certaines lipases, Phatr3_J41624 (Cl3lip3), Phatr3_EG02330 (GDSlip1) et Phatr3_EG02610 (Cl3lip1) dont la régulation semble à l'opposé de l'évolution des paramètres biochimiques suivis ont été identifiées comme pouvant être impliquées dans le recyclage des lipides polaires pendant la carence. Parmi ces enzymes, certaines sont régulées différemment entre les deux écotypes. La lipase Cl3lip3 ainsi que la glucosidase EndoG3 sont surrégulées en carence chez Pt1 mais non régulées chez Pt4. De la même façon, la lipase Cl3lip1 est surrégulée en carence chez Pt4 et peu régulée chez Pt1. Enfin, la lipase PLPlip1 a montré une forte réponse à resupplémentation chez Pt4 uniquement. Cette régulation différentielle est ainsi une piste pour l'élucidation des différences phénotypiques entre les deux écotypes.

3.2 – Article 3

Article en préparation pour soumission à *Algal Research*

Murison, V.; Hérault, J.; Guinio, S.; Côme, M.; Loiseau, C.; Kwasiborski, A.; Marchand, J.; Ulmann, L. Neutral lipid and chrysolaminarin metabolic pathways during nitrogen starvation and cell recovery in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*

Remarque : Les figures et tables présentés dans l'article suivent une numérotation indépendante du reste du manuscrit.

Neutral lipid and chrysolaminarin metabolic pathways during nitrogen starvation and cell recovery in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*

Victor Murison, Josiane Héroult, Sabrina Guinio, Martine Côme, Céline Loiseau, Anthony Kwasiborski, Justine Marchand, Lionel Ulmann

Introduction

When exposed to nutrient stress, especially nitrogen (N) or phosphorus deprivation, microalgae accumulate storage compounds, generally neutral lipids and/or carbohydrates. Neutral lipids are mainly stored in the form of triacylglycerol (TAG) molecules while carbohydrates can be starch in green algae or the soluble β -1,3- glucan chrysolaminarin in diatoms and other stramenopiles [1–3]. The lipid accumulation capacity has been widely investigated, especially with the goal to discover high-producing strains that would serve as biofuel feedstock [4]. The group of diatoms has been particularly considered for this last purpose because of high growth rates, a capacity to adapt to environmental variations and the capacity to reach high lipid content (up to 69% for *Nitzschia laevis*) [1,2]. Chrysolaminarin has also caught the attention of researchers for its potential as an antioxidant and health promoting molecule on animal models [5,6].

However, there is usually a trade-off between growth and product accumulation [7], as the stress that is necessary to obtain high accumulation also stops growth, thus lowering the productivity. A strategy to overcome this difficulty has been to create high-producing strains by overexpressing one (or several) enzymes from the desired metabolic pathways or inactivate concurrent pathways to redirect metabolite flux into the desired products. This kind of strategy requires a good knowledge of metabolic ways to choose efficient targets.

In diatoms, a thorough work has been conducted on neutral lipid accumulation pathways. As in plants, TAG biosynthesis is carried out by two pathways: acyl-CoA dependant (Kennedy pathway) and acyl-CoA independent [8] (**Figure 1**). The Kennedy pathway operates in three steps from glycerol-3-phosphate and acyl-CoA. First, a glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) produces lysophosphatidic acid (LPA) which is taken up by a lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) to produce phosphatidic acid (PA). This phosphatidic acid is dephosphorylated into diacylglycerol (DAG) which then receives a third acyl chain by a diacylglycerol acyltransferase (DGAT), resulting in a TAG molecule. The acyl-CoA independent pathway occurs through the action of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) that uses DAG and a molecule of phospholipid (usually phosphatidyl-choline or phosphatidyl-ethanolamine) and transfers an acyl chain from the phospholipid to the DAG, releasing a TAG molecule and a LPA. TAG are then stored in lipid droplets (LDs), dynamic organelles consisting in a core of TAG delimited by a single-layer polar lipid membrane [9]. Except PDAT, at least

one isoform of each enzyme involved in these pathways has been studied by inactivation and/or overexpression [10–19], often leading to high lipid production. The pathways leading to lipid degradation are much less characterized. It could occur by two pathways, lipolysis on the surface of LDs and lipophagy, a LD-specific pathway of autophagy, inside vacuoles. Both involve the action of lipases. However, although 57 putative lipases have been predicted in the genome of *P. tricornutum*, including 8 that were highly regulated in transcriptomes obtained under nitrogen (N) stress [20], only 3 have been functionally studied [21–23].

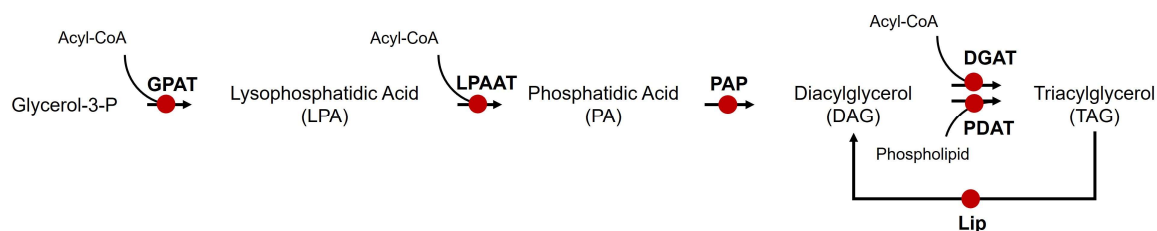


Figure 1: Neutral lipid metabolic pathways. *DGAT*: Diacylglycerol Acyltransferase, *GPAT*: Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, *Lip*: Lipase, *LPAAT*: Lysophosphatidic Acid Acyltransferase, *PAP*: Phosphatidic Acid Phosphatase, *PDAT*: Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase.

Chrysolaminarin metabolism has received less attention than lipid metabolism in diatoms [3]. From the genes present in the genome of *P. tricornutum*, a pathway was reconstructed (**Figure 2**). Glucose phosphate is first converted to UDP-glucose by the action of a UDP-glucose pyrophosphorylase (*UGP*). Then UDP-glucoses are assembled into a linear β -1,3-glucan by the β -1,3-glucan synthase (*BGS*). Chrysolaminarin is obtained after the action of a β -1,6-transglycosylase (*TGS*). At least one isozyme of each of the three enzymes in this pathway have been characterized by functional studies [24–27] confirming their role. Degradation to glucose could be performed by endo- β -glucosidases (*EndoG*) and/or exo- β -glucosidases (*ExoG*) of which none has been studied yet.

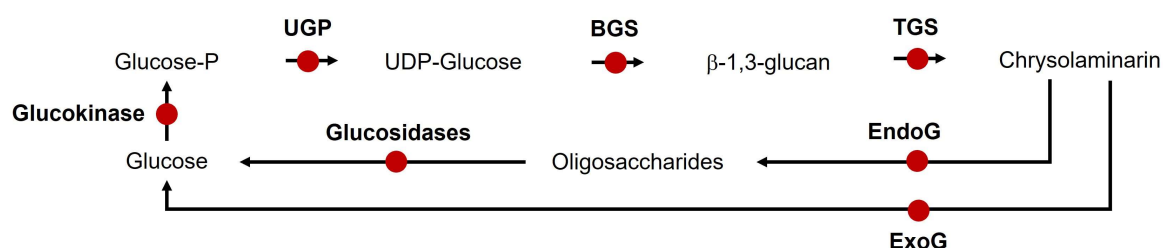


Figure 2: Chrysolaminarin metabolic pathways. *BGS*: β -1,3-glucan synthase, *EndoG*: Endo- β -glucosidase, *ExoG*: Exo- β -glucosidase, *TGS*: β -1,6-transglycosylase, *UGP*: UDP-Glucose Pyrophosphorylase.

An efficient method to investigate pathways associated with storage compound degradation is the use of N recovery experiments where microalgae are first stressed to achieve sufficient

accumulation and then resupplied [28–32]. Although some resupply experiments have been conducted on *P. tricornutum* [33–35], they have not assessed jointly the biochemical and molecular changes induced by the changes in conditions. Hence, we submitted cultures of *P. tricornutum* to conditions of N starvation and nutrient (N and carbon (C)) resupply. We followed biochemical parameters and the expression of key transcripts from the metabolic pathways of neutral lipids and chrysolaminarin. Two ecotypes of *P. tricornutum*, Pt1 and Pt4, were studied as they have been previously highlighted for their differences in storage compounds, N acquisition phenotypes and their genetic distance [36–38]. The results allowed us to describe the sequential variation of chrysolaminarin and neutral lipids observed in *P. tricornutum*, as well as to highlight key target enzymes for genetic engineering studies.

Materials and Methods

Cultivation conditions of Phaeodactylum tricornutum and growth monitoring

Two ecotypes of the diatom *P. tricornutum*, Pt1 (CCMP 2561) and Pt4 (UTEX 646), were cultivated in this study. Erlenmeyer flasks containing autoclaved f/2 medium [39] complemented with 7.5 mL/L 8% NaHCO₃ [40] were inoculated at a cellular density of approximately 10⁵ cells/mL. In all experiments, the cultivation chamber temperature was maintained at 20°C. Light was provided from the side with warm white LED lights on a continuous mode at a sub-saturating light intensity of 200 and 300 μmol/m²/s for Pt4 and Pt1 respectively, as determined from previously established photosynthesis-irradiance curves [37], in order to maximize photosynthesis of each strain while avoiding light stress. Cell density evolution was monitored with a Malassez counting chamber.

Nitrogen (N) starvation and nutrient (N and C) resupply experimental design

In a first experiment, both ecotypes of *P. tricornutum* were pre-cultivated for 7 days in f/2 medium, washed twice with f/2 nitrogen free medium (N₀), transferred to an equal volume of N₀ medium and cultivated for 15 days. Samples were collected at days 0, 3, 7, 11, 15 (**Figure 3**).

A second experiment was then performed with the addition of a NaNO₃ (N+) and/or NaHCO₃ (C+) supplement after 11 days of N starvation. This experimental design defines 4 conditions: N+C+, N+C-, N-C+, N-C- (**Figure 3**). Amounts of N and C to add were calculated based on N and C maximum uptakes determined previously [41]: 6 μg/10⁶ cells/day (NaNO₃) and 17.4 μg/10⁶ cells/day (NaHCO₃). Samples were taken at days 0 and 11 of starvation and after 12 hours, 24 hours and 72 hours from the resupply.

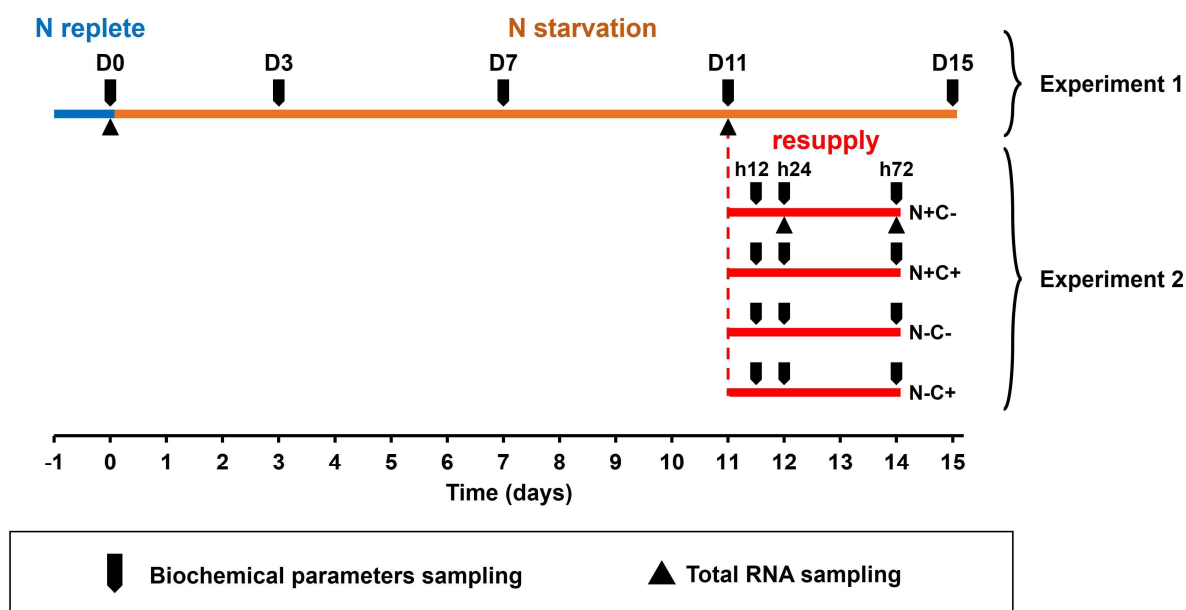


Figure 3: Experimental design of the N starvation and resupply experiments with sampling time points for biochemical analyses and transcript quantification.

Cell quotas in Carbon and Nitrogen

Five mL samples containing at least 30×10^6 cells were harvested at each time point by filtration on Whatman GF/C precombusted glass fiber filters (Fisher Scientific). Samples were then dried at 70°C for 12h and stored at -20°C . Determination of intracellular C and N quotas was carried out with an elemental analyzer (FLASH 2000 NC soil analyzer, Thermo Fisher Scientific) as previously performed [42].

Quantification of soluble proteins, soluble carbohydrates and pigments

Samples of 2 mL of culture (containing 10 to 40×10^6 cells) were harvested by centrifugation ($14,500 \times g$, 10 min), washed once with an isotonic NaCl solution (31 g/L) and used for soluble proteins, soluble carbohydrates or pigment determination.

For proteins and carbohydrates, the pellet was suspended in milli-Q water, acid-washed glass beads were added ($425\text{-}600 \mu\text{m}$, Sigma-Aldrich) and homogenized for 10 min at 50 Hz (TissueLyser LT, Qiagen). After a centrifugation step ($14,500 \times g$, 20 min), the lysate was used to quantify soluble protein through the Bradford assay (Coomassie blue) with Bovine Serum Albumine as a standard [43] and to quantify soluble carbohydrates through the Dubois assay (Phenol-Sulfuric acid) with glucose as a standard [44] (UV 1900i double-beam UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu).

Pigment extraction was performed using 90% acetone as previously described [37]. Briefly, acid-washed glass beads were added together with 90% acetone and the mix was homogenized for 1 min at 50 Hz. The tube was centrifuged ($14,500 \times g$, 10 min) and the

supernatant was conserved in a distinct tube kept in the dark on ice. Then pellet was extracted again until it became white, and the supernatants were pooled. Quantification was performed spectrophotometrically using [45] and [46] equations respectively for chlorophylls and carotenoids.

Lipid extraction, class separation, quantification and fatty acid profile determination

For lipid extraction, 30 mL of culture volume were harvested in tubes which were placed in boiling water for 5 min to prevent lipid degradation [47], and centrifuged ($4,700 \times g$, 20 min, 4°C). The pellet was resuspended in 200 μL of NaCl at 2,8 g/L, transferred in a Dounce grinding tube, and 3 mL of chloroform/methanol (1/2 V/V) was added. After a manual grinding, the mixture was exposed to ultrasounds for 15 min. An additional volume of 2 mL of chloroform was added, inducing phase separation, and the mixture was exposed to ultrasound for 30 min. Then, the lower phase was collected and the solvent evaporated under partial vacuum with a rotary evaporator (Heidolph 94200, Fisher Scientific). The dried extract was resuspended in chloroform and used for neutral lipid isolation. The total lipid extract was loaded on a Sep-pak Plus (Waters) silica column pre-conditioned with 20 mL of methanol and 20 mL of chloroform. Neutral lipids were eluted with 20 mL of chloroform. This fraction was evaporated, and the extract were then resuspended in 1 mL of chloroform.

Fatty acid profiles were determined using a TRACE 1300 gas chromatograph (Thermo Scientific) equipped with a CP-Sil 88 25 m x 0.25 mm capillary column (Varian) using N_2 as a vector gas and coupled to a flame ionization detector (FID). Fatty acids were methylated to Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) through a two-step reaction by first adding of 1 mL of 0.5M sodium hydroxide in methanol, incubating for 20 min at 80°C and then adding 1 mL of 15% (v/v) boron trifluoride in methanol and incubating again under the same conditions. FAMES were then extracted with isooctane by adding a 35% (w/v) NaCl solution for a salting out step. The isooctane phase was then collected and dried with anhydrous sodium sulfate. FAMES were identified by comparing the retention time with that of standards.

Quantification of lipid contents was performed through the addition of a known quantity of C15:0 internal standard to the extracts before methylation, and then by comparing peak areas of C15:0 and of each individual FAME.

RNA extraction and RT-qPCR

For investigating gene expression variations, 200.10^8 cells were harvested by filtration, frozen in liquid nitrogen and total RNAs were extracted with a Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma Aldrich). During washing steps of the extraction process, possible genomic DNA contamination was eliminated by performing an on-column digestion with a DNase solution (On-Column DNase I digestion set, Sigma-Aldrich). RNA extract concentration and quality were assessed

by measuring absorbance at 260, 280 and 230 nm using a Nanodrop One^c spectrophotometer (Thermo Scientific).

Reverse transcription of the RNA extracts was conducted using a M-MLV Reverse Transcriptase (RT) (Promega) in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). As a first step, 1 µg of RNA, 500 ng of oligo(dT)₁₅ primers and 500 ng of random hexamer primers were incubated in a volume of 15 µL at 70°C for 5 min for annealing. Then, as a second step, 10 µL of a mix of dNTP (12.5 nmol), M-MLV RT (200U), RNAse inhibitor (24U) and M-MLV 5X buffer was added and the tubes were incubated at 42°C for 1hr and then at 70°C for 5 min to inactivate the enzyme.

The produced cDNA were diluted 10 times before use. Quantitative PCR was performed in a QuantStudio 3 qPCR system (Applied Biosystems) with a standard program of 1 initiation step at 95°C for 2 min followed by 40 amplification cycles alternating 95°C for 15 s for annealing and 60°C for 1 min for elongation. A volume of 5 µL of cDNA was added to a 15 µL mix containing 10 µL of GoTaq® qPCR Master mix 2X (Promega), 1 µL of each primer forward and reverse (10 µM) and 3 µL of nuclease-free water. Genes from neutral lipid and chrysolaminarin metabolism were selected according to the currently established pathways. Lipase genes for lipid degradation were chosen from our previous screening study [20]. Transcript sequences were retrieved from Ensembl database (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum/Info/Index, accessed on 15/10/2022). The primers designed from these sequences are presented in **Supplementary Table S1**.

To calculate relative expression, Tubulin α (TubA) and Ribosome protein small subunit 30 S (RPS) were chosen as housekeeping genes as they were found to be the most stable out of 10 candidate genes (Actin 12, Actin 16, Cyclin-dependant kinase A, Elongation factor 1 α , Histone 4, RPS, TATA Box Binding Protein, TubA, Tubulin B, Ubiquitin) by using the online tool RefFinder [48,49] (<https://blooge.cn/RefFinder/>, accessed on 27/01/2023). Then the relative expression for each gene at each time point was calculated from the obtained Ct values and efficiency of each primer pair using the $\Delta\Delta C_t$ method [50], by normalizing to D0 for the N starved time point (D11) and to D11 for N resupply time points (h24 and h72) to see the specific response to nitrogen resupply.

Results & Discussion

Effects of a long-term N starvation on P. tricornutum Pt1 and Pt4 biochemistry and storage compound metabolic pathways

A first 15 days-N starvation experiment was conducted to identify biochemical response patterns of both ecotypes of *P. tricornutum* (Figure 4). Additionally, the regulation of transcripts from storage compound metabolism, monitored under starvation at D11 (relative to D0), is reported in Figure 5 and Supplementary Table S2.

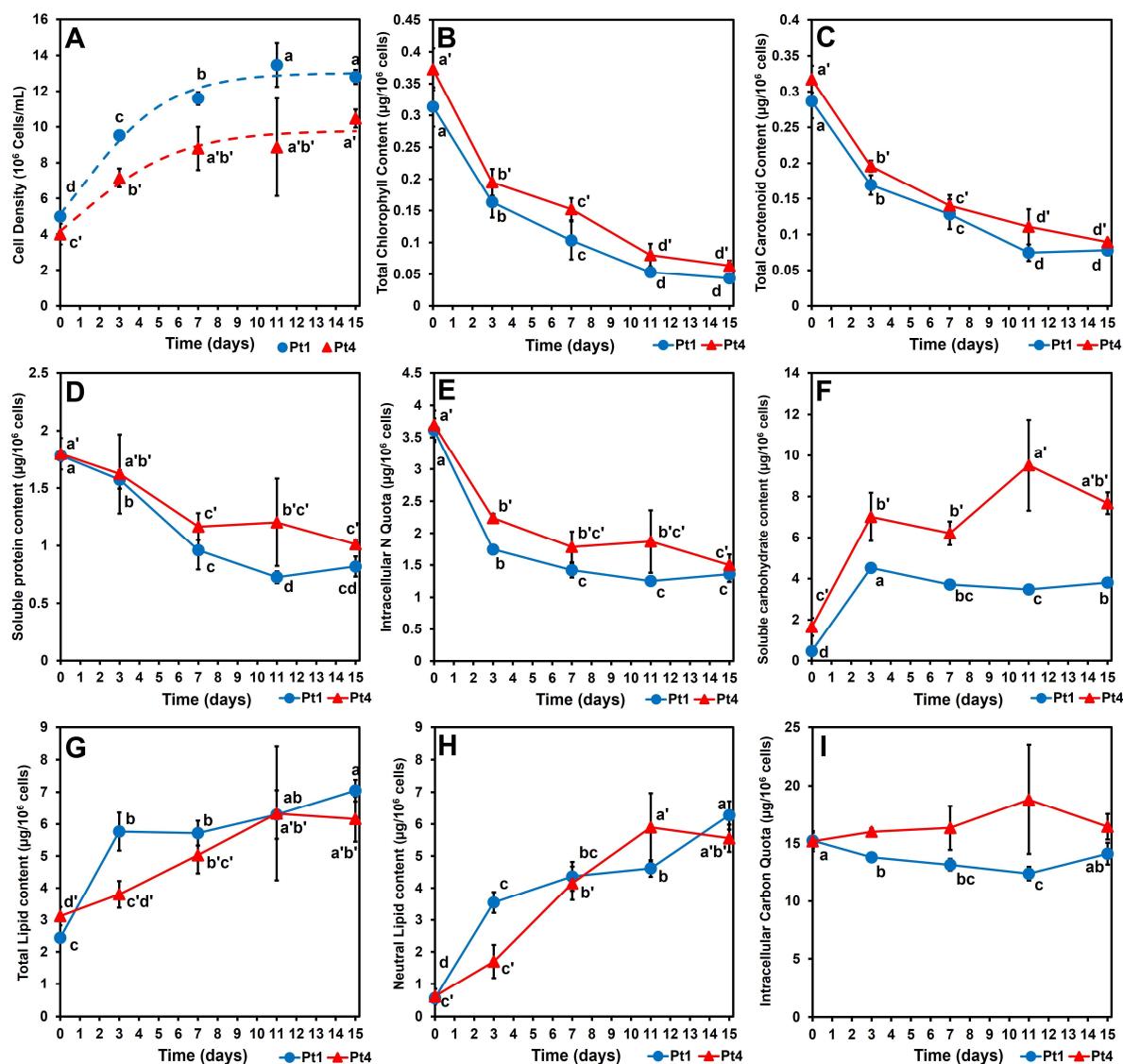


Figure 4: The variations of major biochemical parameters as a response to a nitrogen starvation of 15 days in *Phaeodactylum tricornutum* Pt1 (blue) and Pt4 (red). A: cell density, B: total chlorophyll content, C: total carotenoid content, D: soluble protein content, E: intracellular N quota, F: soluble carbohydrate content, G: total lipid content, H: neutral lipid content, I: intracellular C quota. Values are means \pm standard deviation (n = 3), letters represent significant variations with $a > b > c > d$ for Pt1 and $a' > b' > c' > d'$ for Pt4 (ANOVA and Fisher LSD post-hoc test, p-value < 0.05).

Nitrogen depleted conditions induced an initial reduction in growth followed by an arrest observed by the stabilization of cell density (**Figure 4A**). A difference between ecotypes must be noted with Pt1 reaching higher maximal cell densities as compared to Pt4. As growth get reduced between day 0 and day 7, a reduction in chlorophyll (**Figure 4B**) and carotenoid (**Figure 4C**) contents is also observed, as well as a reduction in soluble protein content (**Figure 4D**). Although Pt4 appeared to have higher contents of these compounds than Pt1, the difference between the two ecotypes were not statistically significant (t-test, p-value>0.05). The general variations of these parameters correspond to the usual response of *P. tricornutum* to N limitation or deficiency [35,51–54]. The observed net degradation of proteins can be linked to the recycling of N-containing molecules to reach a basal level corresponding to proteins that are essential in maintaining the cells in a stand-by state [35]. Pigments are recycled both for their content in N (chlorophylls) and to reduce residual photosynthesis (carotenoids and chlorophylls) that would either way induce oxidative stress through the production of reactive oxygen species [55]. The minimum in intracellular N quota (**Figure 4E**) is reached at day 7 for both ecotypes, which is concomitant with the halt in growth, illustrating the usage of the intracellular N pool for maintaining growth in the first days of starvation, as previously described [56].

Regarding storage compounds, an initial high increase in soluble carbohydrates is observed between day 0 and day 3 (**Figure 4F**), with a subsequent slight decrease for Pt1 and oscillations around the high value for Pt4. Transcripts from the chrysolaminarin synthesis pathway did not show a clear global response at D11 of starvation (**Figure 5**). This is possibly because chrysolaminarin accumulation occurred during the first days of N starvation. However, some chrysolaminarin degradation genes regulation pattern suggest another hypothesis. In Pt1 and Pt4, ExoG5 (Phatr3_43302) was highly downregulated under N starvation (- 10.2-fold and - 2.6-fold in Pt1 and Pt4, respectively), and a similar pattern was observed in EndoG2 (Phatr3_J54973) (- 6.6-fold and - 2-fold in Pt1 and Pt4). This could indicate that chrysolaminarin accumulation occurs by an inactivation of degradation rather than a stimulation of synthesis. Nevertheless, some chrysolaminarin degradation genes were also observed to be upregulated in either Pt1 or Pt4. The β -glucosidase EndoG3 (Phatr3_J52685) was upregulated in Pt1 (+ 2.4-fold) while ExoG1 (Phatr3_J1372) in Pt4 (+ 3.3-fold). These enzymes could also have a function in maintaining chrysolaminarin concentration under N starvation as this parameter appeared nearly constant after D3 of starvation.

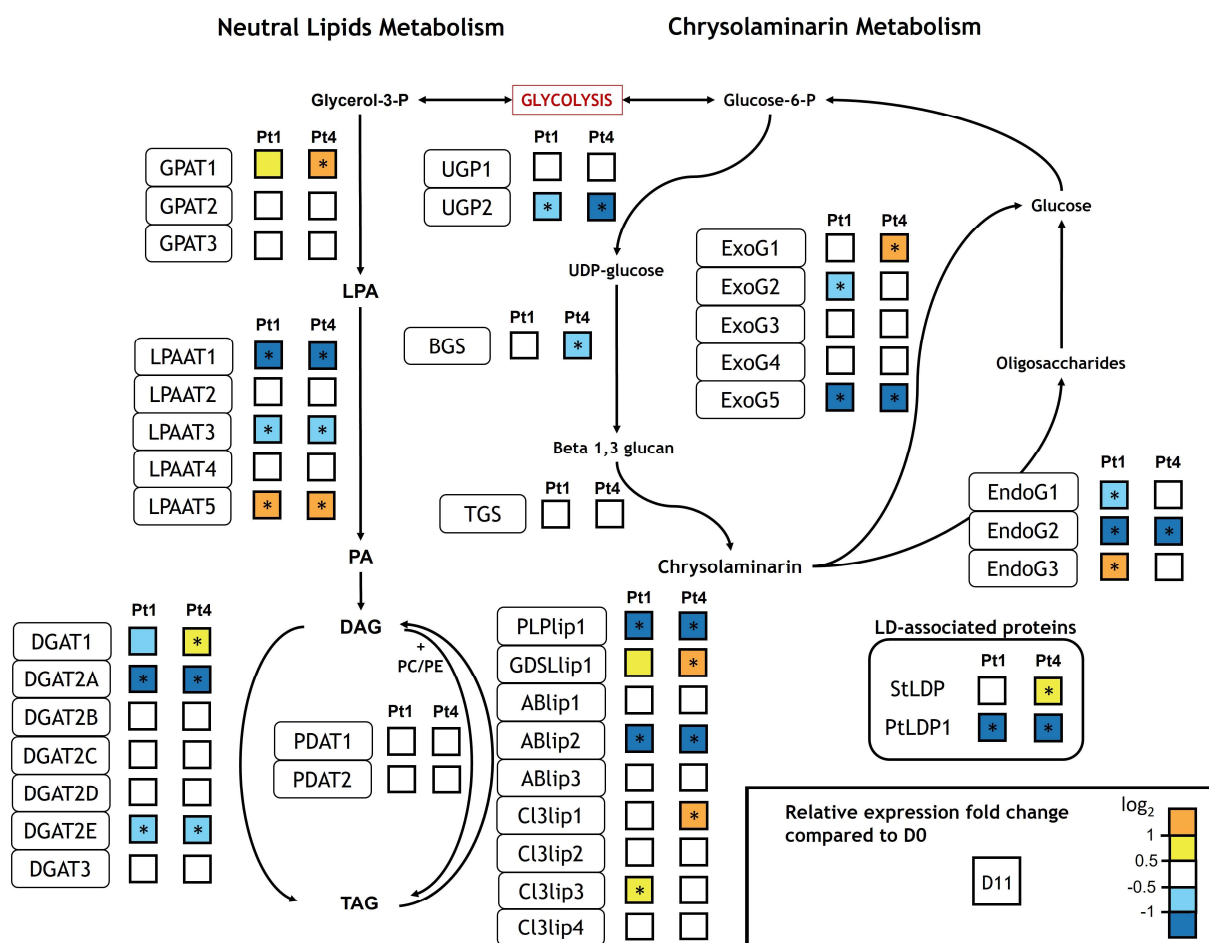


Figure 5: Neutral lipids and chrysolaminarin metabolisms gene expression data obtained under nitrogen starvation. Relative expression (RE) level is coded with colors where white corresponds to the reference point ($\log_2(RE) = 0$), blue indicates downregulation and orange indicates upregulation. Asterisks indicates that the RE value is significantly different from its reference point (*t*-test, *p*-value < 0.01).

Both total (Figure 4G) and neutral lipids (Figure 4H) also increase under N starvation, also differently between ecotypes. The increase is progressive in Pt4 with a maximum value reached at day 11, while there is an initial (day 0 to day 3) high increase in Pt1 followed by a continued increase to day 15. The regulation of genes from neutral lipid metabolic pathways provided functional insight into this accumulation (Figure 5). In the Kennedy pathway of glycerolipid synthesis, the first step is the acylation of glycerol-3-phosphate into lysophosphatidic acid by the GPAT. This enzyme is represented by three isoforms in *P. tricornutum*, of which GPAT1 (Phatr3_J54709) was upregulated (+ 1.6-fold and + 2.3-fold in Pt1 and Pt4, respectively) under N starvation while the other remained stable.

This step is followed by another acylation by a LPAAT. Here, out of the five isoforms, two (LPAAT1, Phatr3_J43099 and LPAAT5, Phatr3_J45551) were highly regulated in opposite directions. LPAAT5 was upregulated under N starvation (+ 4.3-fold and + 5.1-fold in Pt1 and

Pt4, respectively) suggesting a role in triglyceride accumulation as previously highlighted by analyzing overexpressed and downregulated mutant lines [17]. LPAAT1 was downregulated (- 2.2-fold and - 2.6-fold in Pt1 and Pt4) and could have a role in glycolipid synthesis, that also uses the first steps of the Kennedy pathway. Indeed, this protein is located in the plastid while neutral lipid synthesis is thought to occur in the endoplasmic reticulum [12]. Intriguingly, the overexpression of this enzyme also enhanced the accumulation of neutral lipids in mutant cells [12], possibly by “pulling” precursors into TAG production while under standard conditions it would contribute to polar lipid synthesis. This is further suggested by another overexpression study where the overexpression of LPAAT1 and GPAT3 enhanced photosynthesis efficiency and glycolipid synthesis [15].

The addition of a third acyl chain to produce TAG can occur by both acyl-CoA dependant pathway through the action of a DGAT or by the acyl-CoA independent pathway through the action of a PDAT (**Figure 5**). Of the seven DGAT identified in *P. tricornutum*, only DGAT1 (Phatr3_J9794) was upregulated at D11 and only in Pt4 (+ 1.8-fold), while DGAT2A (Phatr3_J49462) and DGAT2E (Phatr3_EG00369) were downregulated in both ecotypes (for DGAT2A, - 3.5-fold and - 3.1-fold in Pt1 and Pt4, for DGAT2E, - 1.6-fold in both ecotypes). The others did not vary in expression. This near-absence of regulation of most isoforms under N stress has previously been described in *P. tricornutum* [54,57,58], suggesting either that some isoforms are inactive, or that they are only active under specific conditions. An insight into the first hypothesis was given by studies in Pt1 which have shown that DGAT1, DGAT2B and DGAT3 were the only isoforms capable of complementing a TAG synthesis deficient yeast [18,59] and that they were also the only ones with a high enzymatic activity towards the main acyl-CoA (C16:0, C16:1 and C20:5) of *P. tricornutum* [18]. The fact that DGATs are not highly regulated also suggests that the production of neutral lipids is mainly controlled upstream of glycerolipid production, by reorienting carbon skeletons (pyruvate and acetyl-CoA) and reducing equivalents to this pathway. Indeed, previous studies have shown that the overexpression of malic enzymes that produces NADPH,H⁺ [60–62] and the inactivation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase that represses acetyl-CoA production [63] both enhanced neutral lipid production. For the acyl-CoA independent pathway, we observed that the two PDAT (Phatr3_J8860 and Phatr3_J49702) were not regulated under N starvation.

P. tricornutum lipid droplets contain two types of major lipid droplet proteins, namely the Stramenopile lipid droplet protein StLDP (Phatr3_J48859) and the *Phaeodactylum tricornutum* lipid droplet protein 1 PtLDP1 (Phatr3_J44488), each identified in one LD proteome study [64,65]. In the present study, under N starvation, StLDP was not regulated (Pt1) or upregulated (Pt4, + 1.72-fold) while PtLDP1 was downregulated in both ecotypes (- 3.7-fold and - 2.7-fold

in Pt1 and Pt4, respectively). A similar mirror regulation pattern was previously described in a transcriptome study in Pt4 [35].

As neutral lipids accumulated under N starvation, we expected TAG lipases to be downregulated. Two lipases, PLPlip1 (Phatr3_EG00720) and ABlip2 (Phatr3_EG02408), were indeed downregulated at D11 (PLPlip1: - 2.3-fold and - 5.9-fold in Pt1 and Pt4, ABlip2: - 5.5-fold and -11-fold in Pt1 and Pt4).

The peak in carbohydrate storage followed by a slower neutral lipid storage that we observed has been described in various microalgae [30,66,67] highlighting that cells shift from a primary carbon storage (carbohydrates) for short-term stress to a secondary one (lipids) for prolonged stress.

Although these compounds accumulated, intracellular carbon quota (**Figure 4I**) remained stable in Pt4 and slightly decreasing between day 0 and day 11 in Pt1. Hence, the increase in storage compounds could not be principally driven by *de novo* carbon fixation but rather by the recycling of already present carbon. This endogenous source of carbon could include polar lipid acyl chains [35,68]. The transcript regulation that we observed for some lipases could indicate their role in this polar lipid recycling. As previously noted in transcriptomic experiments [35,52,69], three lipases were upregulated at D11 of N starvation, namely Cl3lip3 (Phatr3_41624) in Pt1 (+ 1.8-fold) and GDSlip1 (Phatr3_EG02330) and Cl3lip1 (Phatr3_EG02610) in Pt4 (respectively + 2.1-fold and +2.4-fold). This upregulation could indicate a function in polar lipid recycling to fuel neutral lipid synthesis. An additional source of carbon for the accumulation of neutral lipids could be branched-chain amino acids (leucine, isoleucine and valine) backbone [35,70]. The carbon quota of Pt4 was higher than that of Pt1, in line with a higher content in soluble carbohydrate and similar total lipid contents.

The effects of a nitrogen starvation on the fatty acid profile of total lipids (**Table 1, Supplementary Table S3**) and neutral lipids (**Table 1, Supplementary Table S4**) were also assessed. For both ecotypes, the proportion of C16:0 and C16:1 in total lipids increased while the proportions of EPA and DHA decreased (**Table 1, Supplementary Table S3**). This is probably due to the accumulation of TAG species containing three C16 acyl chains (C16:0 or C16:1), the species 48:1 (C16:0/C16:0/C16:1) and 48:2 (C16:1/C16:1/C16:0) being the main TAG molecular species in Pt1 and in Pt4 as previously established [68,71]. Indeed, the same increasing pattern for C16:0 and C16:1 was also observed in neutral lipid fatty acid profiles, although more marked for C16:1, while most other fatty acids decreased (**Table 1, Supplementary Table S4**). We additionally observed that the proportion of EPA in neutral lipids increased in Pt4 at the beginning of N starvation. This is in line with a production of TAG partly from the recycling of plastidial membrane lipids as previously established [35,72].

Intriguingly, EPA remained stable in Pt1 neutral lipids, highlighting a possible difference between ecotypes concerning lipid recycling.

Table 1: Evolution of the three major fatty acid proportions in total lipids and neutral lipids of Pt1 and Pt4 during the nitrogen deficiency experiment of 15 days (molar %, $M \pm SD$, $n=3$). Letters represent significant variations with $a>b>c>d$ for Pt1 and $a'>b'>c'>d'$ for Pt4 (ANOVA and Fisher LSD post-hoc test, p -value < 0.05).

Fatty Acid	Pt1					Pt4				
	D0	D3	D7	D11	D15	D0	D3	D7	D11	D15
Proportions in Total Lipids										
C16:0	17.1 ± 0.2 ^b	28.5 ± 0.5 ^a	29.0 ± 0.5 ^a	28.3 ± 0.1 ^a	29.0 ± 0.2 ^a	14.7 ± 1.4 ^{d'}	24.5 ± 0.8 ^{c'}	27.6 ± 0.7 ^{b'}	28.3 ± 1.0 ^{ab'}	30.2 ± 1.4 ^{a'}
C16:1	22.9 ± 1 ^d	38.3 ± 2.2 ^c	43.1 ± 0.7 ^b	43.1 ± 2.7 ^b	47.6 ± 0.7 ^a	16.8 ± 1.1 ^{c'}	34.8 ± 0.4 ^{b'}	41.8 ± 0.4 ^{a'}	43.1 ± 0.2 ^{a'}	41.4 ± 2.9 ^{a'}
C20:5	19.8 ± 0.2 ^a	12.8 ± 1.1 ^b	10.8 ± 0.3 ^c	8.9 ± 0.8 ^d	9.3 ± 0.5 ^d	26.6 ± 4.0 ^{a'}	13.3 ± 0.3 ^{b'}	7.9 ± 0.3 ^{c'}	6.8 ± 0.5 ^{c'}	6.8 ± 1.0 ^{c'}
Proportions in Neutral Lipids										
C16:0	27.3 ± 2.1 ^c	32.6 ± 0.8 ^a	31 ± 0.1 ^{ab}	30.5 ± 0.3 ^b	30.7 ± 0.3 ^{ab}	27.5 ± 4.2	30.4 ± 0.7	31.0 ± 0.6	31.0 ± 0.8	31.5 ± 0.8
C16:1	29.6 ± 1.6 ^c	46.3 ± 2.2 ^b	48.2 ± 0.4 ^{ab}	50.0 ± 0.6 ^a	50.1 ± 0.7 ^a	18.9 ± 6.3 ^{b'}	43.5 ± 0.6 ^{a'}	44.6 ± 0.7 ^{a'}	45.9 ± 0.0 ^{a'}	46.5 ± 0.4 ^{a'}
C20:5	7.0 ± 0.8	7.5 ± 1.4	8.2 ± 0.1	8.0 ± 0.5	8.0 ± 0.7	4.8 ± 1.0 ^{b'c'}	6.3 ± 0.1 ^{a'}	6.4 ± 0.4 ^{a'}	5.6 ± 0.3 ^{ab'}	4.6 ± 0.1 ^{c'}

Overall, N starvation induced a reduction in growth, soluble proteins and photosynthetic pigments while it caused an initial high accumulation of soluble carbohydrates and a slower but longer accumulation of neutral lipids. This accumulation of storage compounds was concomitant with a regulation of a few specific genes from both synthesis and degradation pathways. At day 11, the intracellular N quota was at a minimum while cell density was at a maximum, highlighting that at this point, the culture was N starved. This D11 point was thus selected for further nutrient recovery experiments.

Nutrient resupply experiment effects on biochemistry and storage compound metabolic pathways

Resupply experiments were conducted to explore the recovery from stress (**Figure 6**). In addition to N resupply, conditions of C resupply were also tested to verify if it impacted or had an interaction effect with N, as dissolved inorganic C could also be a limiting factor of growth [73]. Overall, the C resupply had little to no effect on the global biochemical parameters (data not shown) or on fatty acid profiles (**Table 2, Supplementary Tables S5-S8**). The regulation of transcripts under N resupply compared to D11 of N starvation is reported in **Figure 7** and **Supplementary Table S2**.

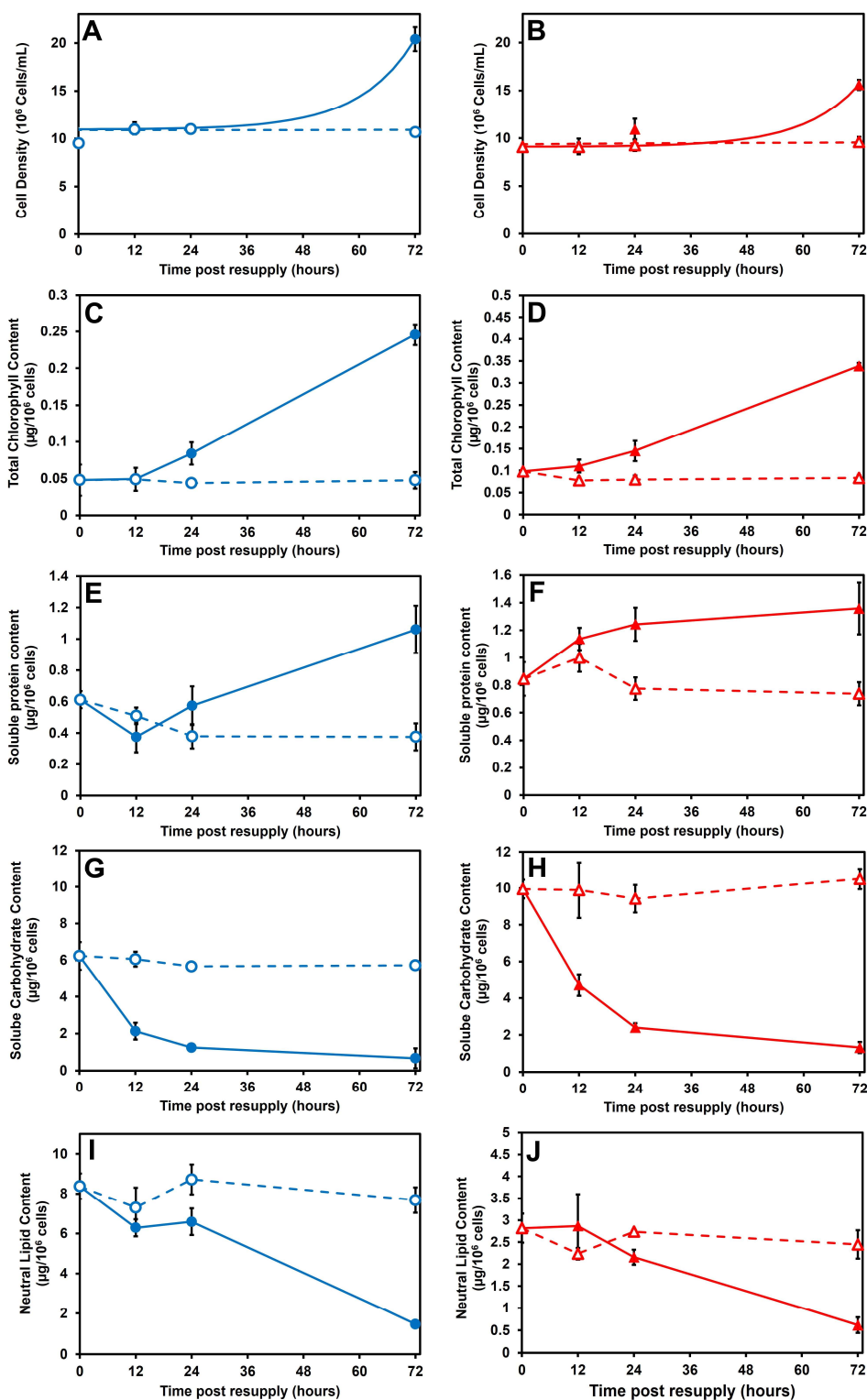


Figure 6: The variations of major biochemical parameters as a response to a nitrogen resupply after a nitrogen starvation of 11 days in *Phaeodactylum tricornutum* Pt1 (blue, left column) and Pt4 (red, right column). Solid lines with filled symbols represent N+ conditions, Dotted lines with open symbols represent N- conditions. Circles represent Pt1 while triangles represent Pt4. A-B: cell density, C-D: total chlorophyll content, E-F: soluble protein content, G-H: soluble carbohydrate content, I-J: neutral lipid content. Values are means \pm standard deviation ($n = 3$).

Table 2: Evolution of the three major fatty acids proportions in total and neutral lipids of Pt1 and Pt4 total lipids during the N resupply experiments (molar %, $M \pm SD$, $n=3$). Letters represent significant variations within each condition with $a>b>c$ (ANOVA and Fisher LSD post-hoc test, p -value < 0.05).

Fatty Acid	N0	N+C+			N+C-		
	D11	h12	h24	h72	h12	h24	h72
Pt1 Total Lipids							
C16:0	28.4 ± 0.3	28.7 ± 0.1 ^a	27.9 ± 0.4 ^a	21.4 ± 0.8 ^b	27.9 ± 0.2 ^a	27.9 ± 1.3 ^a	19.5 ± 1.1 ^b
C16:1	45 ± 0.4	46.7 ± 0 ^a	46.1 ± 0.5 ^a	31.9 ± 0.4 ^b	45.6 ± 0.7 ^a	43.5 ± 2.2 ^a	30.2 ± 2.6 ^b
C20 :5	11.3 ± 0.4	10.7 ± 0.6 ^b	11.4 ± 0.3 ^b	22.4 ± 0.9 ^a	11.9 ± 0.6 ^b	11.7 ± 1.4 ^b	26.1 ± 2.9 ^a
Pt1 Neutral Lipids							
C16:0	30.1 ± 0.4	29.6 ± 0	29.5 ± 0.8	29.1 ± 0.6	29.4 ± 0.1	27.9 ± 1.3	28.1 ± 1.3
C16:1	47.5 ± 0.7	50.1 ± 0.3 ^a	49.9 ± 0.4 ^a	45.3 ± 1.1 ^b	49.5 ± 0 ^a	48.5 ± 2.2 ^a	45.3 ± 1.8 ^b
C20:5	8.5 ± 1.7	8.6 ± 0.5	8.8 ± 1	8.5 ± 0.4	9 ± 0.3	11.7 ± 1.4	8.5 ± 0.3
Pt4 Total Lipids							
C16:0	25.3 ± 0.8	24.9 ± 0.7 ^a	20.4 ± 0.5 ^b	17.1 ± 0.1 ^c	24.6 ± 0.2 ^a	20 ± 0.2 ^b	15.8 ± 0.3 ^c
C16:1	34.9 ± 2.3	35.2 ± 1.6 ^a	31.5 ± 0.4 ^b	25.4 ± 0.5 ^c	38.5 ± 1.1 ^a	30 ± 0.8 ^b	23.5 ± 2 ^c
C20:5	12 ± 2.4	13.5 ± 1.2 ^c	15.9 ± 0.9 ^b	23.9 ± 0.7 ^a	11.1 ± 1.1 ^c	18.4 ± 1 ^b	25.4 ± 2.2 ^a
Pt4 Neutral Lipids							
C16:0	27.5 ± 0.5	28.6 ± 1.4 ^a	24.7 ± 0.1 ^b	30.2 ± 0.5 ^a	27.9 ± 1 ^a	24.7 ± 1.1 ^b	29.1 ± 2.4 ^a
C16:1	40.4 ± 0.8	43 ± 2.1 ^a	38.7 ± 2.5 ^a	31.6 ± 3.1 ^b	42.9 ± 2.3 ^a	37.9 ± 0.2 ^b	23 ± 2 ^c
C20:5	7.9 ± 1.6	6.8 ± 0.8	10.8 ± 1.4	10 ± 3.3	6.4 ± 1.5	10 ± 2.1	10.8 ± 4.9

Focusing on N resupplied conditions, clear responses were observed for the two ecotypes. Growth restarted between the timepoints 24 hrs and 72 hrs post-resupply, leading to an increase in cell density (**Figure 6A-B**). A similar delayed growth has previously been observed in the resupply experiments that have been conducted in *P. tricornutum* [33–35,37,74].

The chlorophyll (**Figure 6C-D**) and soluble protein (**Figure 6E-F**) contents increased with the same patterns between ecotypes, with an increase from 12 hrs after resupply in Pt4 but only starting at 24 hrs for Pt1. These two parameters represent N containing molecules. Hence, the faster recovery observed for Pt4 could indicate a higher capacity to incorporate N from its environment. A previous genomic comparison between ecotypes of *P. tricornutum* indeed highlighted that Pt4 could have an altered way of nitrogen acquisition, as its genome contains a higher number of copies of a gene from the nitrate assimilation pathway (nitrite reductase, Phatr3_EG02286) [38]. Additionally, a phenotypic comparison between Pt1 and Pt4 also found that Pt4 had a higher N intake rate per cell [36].

The soluble carbohydrate content (**Figure 6G-H**) evolved in the same way for both ecotypes with an early consumption starting within 12 hours after nitrogen addition. As under N starvation, chrysolaminarin synthesis genes were not highly regulated (**Figure 7**), except for UGP1 that was downregulated in Pt4 at the 24 hrs time point (- 2.1-fold). For degradation genes, as also highlighted under N starvation, ExoG5 might be the main actor in chrysolaminarin degradation in *P. tricornutum* as it experienced a high upregulation with the switch to N resupply (from + 2-fold to +7.8-fold between ecotypes and timepoints). Exo- β -glucosidases 2 to 4 (Phatr3_J45418, Phatr3_J49610 and Phatr3_J54569) were apparently downregulated upon N resupply, meaning they could have had a function in carbohydrate homeostasis during N starvation, becoming unnecessary after degradation. Finally, EndoG3 that was upregulated under N starvation in Pt1 also showed a N resupply responsive pattern, being highly downregulated after resupply (- 6.4-fold and - 10.1-fold at 24 and 72 hrs of resupply).

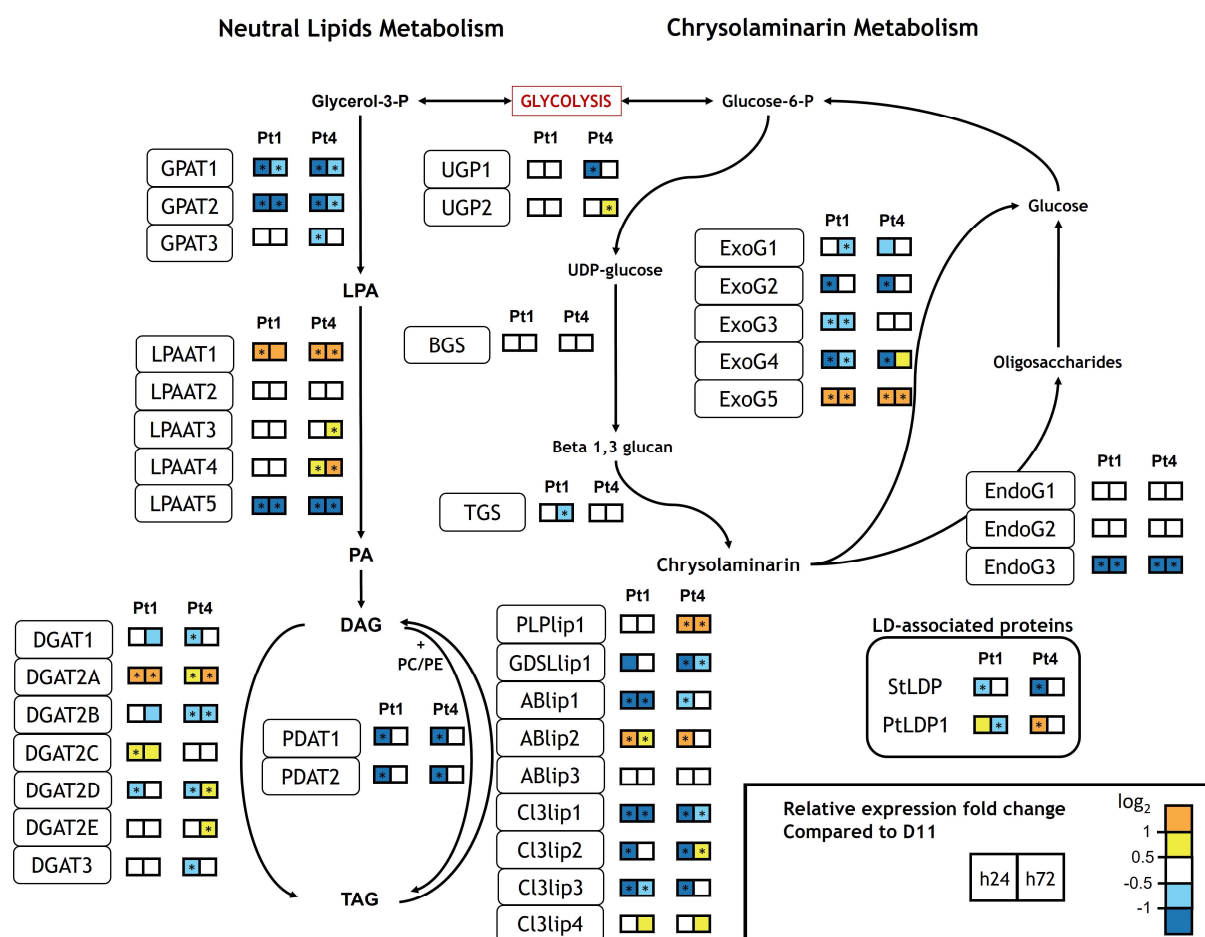


Figure 7: Neutral lipids and chrysolaminarin metabolisms gene expression data obtained under nitrogen resupply. Relative expression (RE) level is coded with colors where white corresponds to the reference point ($\log_2(RE) = 0$), blue indicates downregulation and orange indicates upregulation.

Asterisks indicates that the RE value is significantly different from its reference point (t-test, p-value < 0.01).

Thus, when taking together N starvation and resupply, although a few specific enzymes correspond to variations in biochemical composition (ExoG5, EndoG2 and UGP1), most carbohydrate metabolism enzymes were not regulated as expected from these variations. A similar observation has already been made in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* [75] *Monoraphidium neglectum* [28] and *Tetraselmis chuii* [32]. These studies propose that post-transcriptional or post-translational regulation should have an important role to explain the overexpression of enzymes that should not be present (e.g. amylases under starch accumulation).

By comparison to carbohydrates, neutral lipid content (**Figure 6I-J**) decreased in a delayed way, occurring between the time points 24 hrs and 72 hrs after resupply, concomitantly with the restart in cell division. The consumption of neutral lipids can also be observed on the fatty acid profiles of total and neutral lipids (**Table 2, Supplementary Tables S5-S8**) where C16:0 and C16:1 relative importance in total lipids are reduced while C20:5 increased. In neutral lipids, it was mostly C16:1 that varied, suggesting that the TAG main species 48:2 (C16:1/C16:1/C16:0) was preferentially degraded. As a further element on Pt4 faster response to N resupply as compared to Pt1, its fatty acid profiles changed progressively starting from 24 hrs post-resupply while Pt1 ones changed more abruptly between 24 hrs and 72 hrs post-resupply. For mRNA regulation, Kennedy pathway GPAT and LPAAT that were regulated under N starvation showed opposite patterns after resupply. Indeed, GPAT1 was downregulated (from - 1.7-fold to - 4.2-fold depending on the ecotypes and time points), as well as LPAAT5 (from - 2.2-fold to - 3.8-fold depending on the ecotypes and time points), highlighting these two genes for their potential role in neutral lipid synthesis. LPAAT1 was also responsive to N resupply by being upregulated (from + 3.1-fold to + 4.1-fold depending on the ecotypes and time points) after a downregulation under N starvation. As LPAAT1 was highlighted for its potential role in polar lipid synthesis in the plastid (see **3.1**), this pattern is also coherent with N recovery of plastid functions. Another Kennedy pathway plastidial enzyme, DGAT2A (Phatr3_J49462), was upregulated after resupply (from + 2-fold to + 3-fold depending on the ecotypes and time points). This isoform has been located in the inner part of the plastid [76] and its overexpression was previously shown to enhance photosynthesis efficiency [10]. Thus, it may have a function in regulating glycerolipid homeostasis inside the plastid upon changes in nitrogen availability.

Considering the acyl-CoA independent pathway, both PDAT genes were downregulated upon N resupply (from - 2.4-fold to - 3.2-fold depending on the ecotypes and time points), coherently with a shift of metabolism from anabolism to catabolism of neutral lipids.

The mirror regulation pattern observed for the two major lipid droplet proteins under N starvation was also observed after 24 hrs of N resupply but with reversed directions. StLDP was downregulated (- 1.9-fold and - 3.1-fold in Pt1 and Pt4, respectively) while PtLDP1 was upregulated (+ 1.7-fold and + 4.3-fold in Pt1 and Pt4, respectively). Currently, the respective functions of each lipid droplet protein are not precisely known, but PtLDP1 was described to enhance the accumulation of neutral lipids when overexpressed [65] while StLDP likely controls the size of LDs as knock-out lines have larger LDs [74,77]. In a previous work, we also observed that 24 hrs after the addition of nitrogen, there are no large LDs anymore as they get fragmented [37]. From these elements we hypothesize that PtLDP1 could regulate small LDs behavior while StLDP regulates large LDs.

Considering lipid consumption genes, one lipase, ABlip2 exhibited the same response in the two ecotypes with a high upregulation (+ 6.5-fold in Pt1 and +11.9-fold in Pt4) at 24 hrs and a downregulation at 72 hrs, indicating that it was expressed only on the moment or just before neutral lipid degradation. This gene is indeed a good candidate for being one of the main lipases acting in lipolysis in *P. tricornutum*. Another lipase, PLPlip1, was upregulated in Pt4 all along N resupply (+ 3.8-fold and + 3.4-fold at 24 and 72 hrs of resupply) so it might also participate in ecotype-specific lipid degradation processes as this response was not observed in Pt1.

Most remaining lipases were clearly downregulated upon N resupply. As mentioned for the lipases upregulated under N starvation (see 3.1), these lipases may degrade polar lipids to fuel neutral lipid synthesis. The presence of such a high number of lipases for similar functions could be solved by a high specificity of each enzyme regarding substrate specificity or possibly subcellular localization, as diatoms intracellular organization is highly complex. Such a functional redundancy can also be noted for the β -glucosidases. This topic requires to focus future research on these reactions and highlights that lipid degradation as well as carbohydrates metabolism need to be investigated more in diatoms.

When summing up soluble carbohydrate and neutral lipid content responses to N resupply, we observed a two-stage mechanism. This is in line with the pattern observed in other microalgae experiencing N recovery [29,30,67]. These studies conducted on green algae described that storage carbohydrates serve for the initial response of cells after N resupply as they can be quickly consumed by glycolysis and the tricarboxylic acid cycle. This fast consumption permits the restart of photosynthesis, nitrogen assimilation and possibly polar lipid synthesis. The role of neutral lipids is more discussed but imply a slow process releasing fatty acids. In *Chlorella* sp., neutral lipids were suggested to be feeding polar lipid synthesis through the release of fatty acids [29]. In *Scenedesmus acuminatus* and *Chlamydomonas reinhardtii*, the fatty acids

released after degradation of the neutral lipids could be degraded by β -oxidation to produce the energy required for restarting the cell cycle [30,67].

Altogether, these results suggest that *P. tricornutum* cells preferentially use the stored carbohydrates for the immediate recovery (within the first 24 hours), possibly including the restart of photosynthesis, the production of proteins and, in turn, of cell cycle. Afterwards, neutral lipids are mobilized and could fuel cell division (between timepoints 24 hours and 72 hours).

Conclusion

In this study we deciphered the biochemical and molecular responses of *P. tricornutum* Pt1 and Pt4 to a period of N starvation followed by a period of N resupply. We highlighted that chrysolaminarin and TAG both acted as carbon and energy storage, being accumulated under N starvation, and consumed upon N resupply. However, chrysolaminarin appeared to be a primary storage molecule, being accumulated and consumed rapidly upon a change in conditions, while TAG was a secondary storage molecule slowly mobilized. It also appeared that Pt4 recovered from N stress more rapidly than Pt1, at least in terms of N-containing molecules. Further comparison between ecotypes was conducted through the regulation of their lipid and carbohydrate metabolic pathways and we found that most genes were regulated similarly while others appeared to be ecotype specific and could contribute to their different behavior regarding N supply.

Among all the genes, some appeared particularly regulated upon N resupply highlighting their implication in the different pathways, namely LPAAT5 (Phatr3_J45551) for lipid synthesis, ABlip2 (Phatr3_EG02408) and to a lesser extent PLPlip1 (Phatr3_EG00720) for lipid degradation, ExoG5 (Phatr3_43302) and EndoG3 (Phatr3_52685) for chrysolaminarin degradation. These should serve as targets for future inactivation and/or overexpression studies, especially in the yet poorly known degradation pathways.

Acknowledgements:

The authors would like to thank Gaël Bougaran and Clarisse Hubert from IFREMER Nantes (Respectively Physiologie et Biotechnologie des Algues (PBA) and, Métabolites des micro-algues (METALG) laboratories) for the N and C quota measurements.

References

- [1] M. Hildebrand, A.K. Davis, S.R. Smith, J.C. Traller, R. Abbriano, The place of diatoms in the biofuels industry, *Biofuels*. 3 (2012) 221–240. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.157>.
- [2] O. Sayanova, V. Mimouni, L. Ulmann, A. Morant, V. Pasquet, B. Schoefs, J.A. Napier, Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms, *Phil. Trans. R. Soc. B*. 372 (2017) 20160407. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0407>.
- [3] J. Chen, J. Yang, H. Du, M. Aslam, W. Wang, W. Chen, T. Li, Z. Liu, X. Liu, Laminarin, a major polysaccharide in Stramenopiles, *Mar. Drugs*. 19 (2021) 576. <https://doi.org/10.3390/md19100576>.
- [4] J.Y. Kim, J.-M. Jung, S. Jung, Y.-K. Park, Y.F. Tsang, K.-Y.A. Lin, Y.-E. Choi, E.E. Kwon, Biodiesel from microalgae: recent progress and key challenges, *Prog. Energy Combust. Sci.* 93 (2022) 101020. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2022.101020>.
- [5] S. Xia, B. Gao, A. Li, J. Xiong, Z. Ao, C. Zhang, Preliminary characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom *Odontella aurita*, *Mar. Drugs*. 12 (2014) 4883–4897. <https://doi.org/10.3390/md12094883>.
- [6] C. Carballo, E.G. Chronopoulou, S. Letsiou, C. Maya, N.E. Labrou, C. Infante, D.M. Power, M. Machado, Antioxidant capacity and immunomodulatory effects of a chrysolaminarin-enriched extract in Senegalese sole, *Fish & Shellfish Immunology*. 82 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.052>.
- [7] P. Singh, S. Kumari, A. Guldhe, R. Misra, I. Rawat, F. Bux, Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 55 (2016) 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.001>.
- [8] N.N. Zulu, K. Zienkiewicz, K. Vollheyde, I. Feussner, Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms, *Prog. Lipid Res.* 70 (2018) 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001>.
- [9] B. Leyland, S. Boussiba, I. Khozin-Goldberg, A review of diatom lipid droplets, *Biology*. 9 (2020) 38. <https://doi.org/10.3390/biology9020038>.
- [10] Y.-F. Niu, M.-H. Zhang, D.-W. Li, W.-D. Yang, J.-S. Liu, W.-B. Bai, H.-Y. Li, Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a Type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Mar. Drugs*. 11 (2013) 4558–4569. <https://doi.org/10.3390/md11114558>.
- [11] Y.-F. Niu, X. Wang, D.-X. Hu, S. Balamurugan, D.-W. Li, W.-D. Yang, J.-S. Liu, H.-Y. Li, Molecular characterization of a glycerol-3-phosphate acyltransferase reveals key features essential for triacylglycerol production in *Phaeodactylum tricorutum*, *Biotechnol. Biofuels*. 9 (2016) 60. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0478-1>.
- [12] S. Balamurugan, X. Wang, H.-L. Wang, C.-J. An, H. Li, D.-W. Li, W.-D. Yang, J.-S. Liu, H.-Y. Li, Occurrence of plastidial triacylglycerol synthesis and the potential regulatory role of AGPAT in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Biotechnol. Biofuels*. 10 (2017) 97. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0786-0>.
- [13] J. Dinamarca, O. Levitan, G.K. Kumaraswamy, D.S. Lun, P.G. Falkowski, Overexpression of a diacylglycerol acyltransferase gene in *Phaeodactylum tricorutum* directs carbon towards lipid biosynthesis, *J. Phycol.* 53 (2017) 405–414. <https://doi.org/10.1111/jpy.12513>.
- [14] Y. Cui, J. Zhao, Y. Wang, S. Qin, Y. Lu, Characterization and engineering of a dual-function diacylglycerol acyltransferase in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Biotechnol. Biofuels*. 11 (2018) 32. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1029-8>.
- [15] X. Wang, H.-P. Dong, W. Wei, S. Balamurugan, W.-D. Yang, J.-S. Liu, H.-Y. Li, Dual expression of plastidial GPAT1 and LPAT1 regulates triacylglycerol production and the fatty acid profile in *Phaeodactylum tricorutum*, *Biotechnol. Biofuels*. 11 (2018) 318. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1317-3>.
- [16] X. Wang, S.-F. Liu, R.-Y. Li, W.-D. Yang, J.-S. Liu, C.S.K. Lin, S. Balamurugan, H.-Y. Li, TAG pathway engineering via GPAT2 concurrently potentiates abiotic stress tolerance and oleaginicities in *Phaeodactylum tricorutum*, *Biotechnol. Biofuels*. 13 (2020) 160. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01799-5>.

- [17] S. Li, Y. Chen, Y. Wang, X. Yang, J. Wang, H. Chen, Over-expression of LPAAT gene in *Phaeodactylum tricorutum* enhances fatty acid accumulation and increases fatty acid chain length, *Indian J. Pharm. Sci.* 82 (2020). <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.spl.76>.
- [18] Y. Zhang, Y. Pan, W. Ding, H. Hu, J. Liu, Lipid production is more than doubled by manipulating a diacylglycerol acyltransferase in algae, *GCB Bioenergy*. 13 (2021) 185–200. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12771>.
- [19] L. You, J. Jouhet, E. Maréchal, A. Amato, X. Hao, D. Zhang, A. Banaś, Y. Gong, Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase from the unicellular diatom *Phaeodactylum tricorutum* (PtLPCAT1) is involved in triacylglycerol and galactoglycerolipid synthesis and enhances eicosapentaenoic acid accumulation in recombinant oleaginous yeast, *Plant Biotechnol. J.* 21 (2023) 238–240. <https://doi.org/10.1111/pbi.13952>.
- [20] V. Murison, J. Héroult, B. Schoefs, J. Marchand, L. Ulmann, Bioinformatics-based screening approach for the identification and characterization of lipolytic enzymes from the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Mar. Drugs*. 21 (2023) 125. <https://doi.org/10.3390/md21020125>.
- [21] F. Barka, M. Angstenberger, T. Ahrendt, W. Lorenzen, H.B. Bode, C. Büchel, Identification of a triacylglycerol lipase in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Biomembr.* 1861 (2016) 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.bbalm.2015.12.023>.
- [22] X. Li, Y. Pan, H. Hu, Identification of the triacylglycerol lipase in the chloroplast envelope of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Algal Res.* 33 (2018) 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.023>.
- [23] Q. Shu, Y. Pan, H. Hu, CGI-58 protein acts as a positive regulator of triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricorutum*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 33 (2023) 1–9. <https://doi.org/10.4014/jmb.2209.09029>.
- [24] W. Huang, I. Haferkamp, B. Lepetit, M. Molchanova, S. Hou, W. Jeblick, C. Río Bártulos, P.G. Kroth, Reduced vacuolar β -1,3-glucan synthesis affects carbohydrate metabolism as well as plastid homeostasis and structure in *Phaeodactylum tricorutum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115 (2018) 4791–4796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719274115>.
- [25] X. Jiang, B. Zhu, C. Tu, Y. Li, Y. Zhao, G. Yang, K. Pan, Silencing 1,3- β -glucan synthase gene promotes total lipid production and changes fatty acids composition by affecting carbon flow distribution in *Phaeodactylum tricorutum*, *Algal Res.* 67 (2022) 102827. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102827>.
- [26] Y.-F. Yang, D.-W. Li, S. Balamurugan, X. Wang, W.-D. Yang, H.-Y. Li, Chrysolaminarin biosynthesis in the diatom is enhanced by overexpression of 1,6- β -transglycosylase, *Algal Res.* 66 (2022) 102817. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102817>.
- [27] F. Daboussi, S. Leduc, A. Maréchal, G. Dubois, V. Guyot, C. Perez-Michaut, A. Amato, A. Falciatore, A. Juillerat, M. Beurdeley, D.F. Voytas, L. Cavarec, P. Duchateau, Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricorutum* for biotechnology, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3831. <https://doi.org/10.1038/ncomms4831>.
- [28] D. Jaeger, A. Winkler, J.H. Mussgnug, J. Kalinowski, A. Goesmann, O. Kruse, Time-resolved transcriptome analysis and lipid pathway reconstruction of the oleaginous green microalga *Monoraphidium neglectum* reveal a model for triacylglycerol and lipid hyperaccumulation, *Biotechnol. Biofuels*. 10 (2017) 197. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0882-1>.
- [29] S. Zhu, P. Feng, J. Feng, J. Xu, Z. Wang, J. Xu, Z. Yuan, The roles of starch and lipid in *Chlorella* sp. during cell recovery from nitrogen starvation, *Bioresour. Technol.* 247 (2018) 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.120>.
- [30] Y. Zhang, H. Wu, C. Yuan, T. Li, A. Li, Growth, biochemical composition, and photosynthetic performance of *Scenedesmus acuminatus* during nitrogen starvation and resupply, *J. Appl. Phycol.* 31 (2019) 2797–2809. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01783-z>.
- [31] A. Zienkiewicz, K. Zienkiewicz, E. Poliner, J.A. Pulman, Z.-Y. Du, G. Stefano, C.-H. Tsai, P. Horn, I. Feussner, E.M. Farre, K.L. Childs, F. Brandizzi, C. Benning, The microalga *Nannochloropsis* during transition from quiescence to autotrophy in response to nitrogen availability, *Plant Physiol.* 182 (2020) 819–839. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00854>.

- [32] G. Carnovale, C. Lama, S. Torres, F. Rosa, L. Mantecón, S.J. Horn, K. Skjånes, C. Infante, Metabolic pathways for biosynthesis and degradation of starch in *Tetraselmis chui* during nitrogen deprivation and recovery, *Bioresour. Technol.* 354 (2022) 127222. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127222>.
- [33] J. Valenzuela, R.P. Carlson, R. Gerlach, K. Cooksey, B.M. Peyton, B. Bothner, M.W. Fields, Nutrient resupplementation arrests bio-oil accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 7049–7059. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5010-y>.
- [34] D. Jallet, D. Xing, A. Hughes, M. Moosburner, M.P. Simmons, A.E. Allen, G. Peers, Mitochondrial fatty acid β -oxidation is required for storage-lipid catabolism in a marine diatom, *New Phytol.* 228 (2020) 946–958. <https://doi.org/10.1111/nph.16744>.
- [35] M. Scarsini, S. Thiriet-Rupert, B. Veidl, F. Mondeguer, H. Hu, J. Marchand, B. Schoefs, The transition toward nitrogen deprivation in diatoms requires chloroplast stand-by and deep metabolic reshuffling, *Front. Plant Sci.* 12 (2022) 760516. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.760516>.
- [36] M. Scarsini, A. Thurotte, B. Veidl, F. Amiard, F. Niepceron, M. Badawi, F. Lagarde, B. Schoefs, J. Marchand, Metabolite quantification by Fourier transform infrared spectroscopy in diatoms: proof of concept on *Phaeodactylum tricornutum*, *Front. Plant Sci.* 12 (2021) 756421. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.756421>.
- [37] V. Murison, J. Hérault, M. Côme, S. Guinio, A. Lebon, C. Chamot, M. Bénard, L. Galas, B. Schoefs, J. Marchand, M. Bardor, L. Ulmann, Comparison of two *Phaeodactylum tricornutum* ecotypes under nitrogen starvation and resupply reveals distinct lipid accumulation strategies but a common degradation process, *Front. Plant Sci.* 14 (2023) 1257500. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1257500>.
- [38] A. Rastogi, F.R.J. Vieira, A.-F. Deton-Cabanillas, A. Veluchamy, C. Cantrel, G. Wang, P. Vanormelingen, C. Bowler, G. Piganeau, H. Hu, L. Tirichine, A genomics approach reveals the global genetic polymorphism, structure, and functional diversity of ten accessions of the marine model diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *ISME J.* 14 (2020) 347–363. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0528-3>.
- [39] R.R.L. Guillard, J.H. Ryther, Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran., *Can. J. Microbiol.* 8 (1962) 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>.
- [40] P. Heydarzadeh, B. Veidl, B. Huang, E. Lukomska, G. Wielgosz-Collin, A. Couzinet-Mossion, G. Bougaran, J. Marchand, B. Schoefs, Carbon orientation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: the effects of carbon limitation and photon flux density, *Front. Plant Sci.* 10 (2019) 471. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00471>.
- [41] J. Levering, J. Broddrick, C.L. Dupont, G. Peers, K. Beeri, J. Mayers, A.A. Gallina, A.E. Allen, B.O. Palsson, K. Zengler, Genome-scale model reveals metabolic basis of biomass partitioning in a model diatom, *PLoS ONE.* 11 (2016) e0155038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155038>.
- [42] B. Huang, J. Marchand, V. Blanckaert, E. Lukomska, L. Ulmann, G. Wielgosz-Collin, V. Rabesaotra, B. Moreau, G. Bougaran, V. Mimouni, A. Morant-Manceau, Nitrogen and phosphorus limitations induce carbon partitioning and membrane lipid remodelling in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Eur. J. Phycol.* 54 (2019) 342–358. <https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1567823>.
- [43] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [44] Michel. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, Fred. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- [45] S.W. Jeffrey, G.F. Humphrey, New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton, *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 167 (1975) 191–194. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3).
- [46] J.I. Carreto, J.A. Catoggio, An indirect method for the rapid estimation of carotenoid contents in *Phaeodactylum tricornutum*: possible application to other marine algae, *Mar. Biol.* 40 (1977) 109–116.
- [47] J.-P. Bergé, J.-P. Gouygou, J.-P. Dubacq, P. Durand, Reassessment of lipid composition of the diatom *Skeletonema costatum*, *Phytochemistry.* 39 (1995) 1017–1021. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00156-N](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00156-N).
- [48] F. Xie, P. Xiao, D. Chen, L. Xu, B. Zhang, miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs, *Plant Mol. Biol.* 80 (2012) 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>.

- [49] F. Xie, J. Wang, B. Zhang, RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes, *Funct. Integr. Genomics*. 23 (2023) 125. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01055-7>.
- [50] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method, *Methods*. 25 (2001) 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [51] L.T. Guerra, O. Levitan, M.J. Frada, J.S. Sun, P.G. Falkowski, G.C. Dismukes, Regulatory branch points affecting protein and lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Biomass Bioenergy*. 59 (2013) 306–315. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.10.007>.
- [52] L. Alipanah, J. Rohloff, P. Winge, A.M. Bones, T. Brembu, Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *EXBOTJ*. 66 (2015) 6281–6296. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv340>.
- [53] J. Longworth, D. Wu, M. Huete-Ortega, P.C. Wright, S. Vaidyanathan, Proteome response of *Phaeodactylum tricornutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion, *Algal Res.* 18 (2016) 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.015>.
- [54] I.M. Remmers, S. D'Adamo, D.E. Martens, R.C.H. De Vos, R. Mumm, A.H.P. America, J.H.G. Cordewener, L.V. Bakker, S.A. Peters, R.H. Wijffels, P.P. Lamers, Orchestration of transcriptome, proteome and metabolome in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during nitrogen limitation, *Algal Res.* 35 (2018) 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.012>.
- [55] Y. Maeda, D. Nojima, T. Yoshino, T. Tanaka, Structure and properties of oil bodies in diatoms, *Phil. Trans. R. Soc. B*. 372 (2017) 20160408. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0408>.
- [56] N.Yu. Shoman, The dynamics of the intracellular contents of carbon, nitrogen, and chlorophyll a under conditions of batch growth of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897) at different light intensities, *Russ. J. Mar. Biol.* 41 (2015) 356–362. <https://doi.org/10.1134/S1063074015050132>.
- [57] Z.-K. Yang, Y.-F. Niu, Y.-H. Ma, J. Xue, M.-H. Zhang, W.-D. Yang, J.-S. Liu, S.-H. Lu, Y. Guan, H.-Y. Li, Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation, *Biotechnol. Biofuels*. 6 (2013) 67. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-67>.
- [58] O. Levitan, J. Dinamarca, E. Zelzion, D.S. Lun, L.T. Guerra, M.K. Kim, J. Kim, B.A.S. Van Mooy, D. Bhattacharya, P.G. Falkowski, Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) 412–417. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419818112>.
- [59] Y. Gong, J. Zhang, X. Guo, X. Wan, Z. Liang, C.J. Hu, M. Jiang, Identification and characterization of PtDGAT2B, an acyltransferase of the DGAT2 acyl-Coenzyme A: Diacylglycerol acyltransferase family in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *FEBS Lett.* 587 (2013) 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.015>.
- [60] J. Xue, Y.-F. Niu, T. Huang, W.-D. Yang, J.-S. Liu, H.-Y. Li, Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation, *Metab. Eng.* 27 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.10.002>.
- [61] B.-H. Zhu, R.-H. Zhang, N.-N. Lv, G.-P. Yang, Y.-S. Wang, K.-H. Pan, The role of malic enzyme on promoting total lipid and fatty acid production in *Phaeodactylum tricornutum*, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 826. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00826>.
- [62] R. Zhang, B. Zhu, C. Tu, Y. Li, Y. Zhao, K. Pan, The combined effect of nitrogen deprivation and overexpression of malic enzyme gene on growth and lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*, *J. Appl. Phycol.* 33 (2021) 3637–3645. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02587-w>.
- [63] Y.-H. Ma, X. Wang, Y.-F. Niu, Z.-K. Yang, M.-H. Zhang, Z.-M. Wang, W.-D. Yang, J.-S. Liu, H.-Y. Li, Antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase promotes the neutral lipid accumulation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Microb. Cell. Fact.* 13 (2014) 100. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0100-9>.
- [64] K. Yoneda, M. Yoshida, I. Suzuki, M.M. Watanabe, Identification of a major lipid droplet protein in a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Plant Cell Physiol.* 57 (2016) 397–406. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv204>.
- [65] X. Wang, T.-B. Hao, S. Balamurugan, W.-D. Yang, J.-S. Liu, H.-P. Dong, H.-Y. Li, A lipid droplet-associated protein involved in lipid droplet biogenesis and triacylglycerol accumulation in the oleaginous microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Algal Res.* 26 (2017) 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.028>.

- [66] Y. Li, D. Han, M. Sommerfeld, Q. Hu, Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.036>.
- [67] M. Siaux, S. Cui n , C. Cagnon, B. Fessler, M. Nguyen, P. Carrier, A. Beyly, F. Beisson, C. Triantaphyllid s, Y. Li-Beisson, G. Peltier, Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves, *BMC Biotechnol.* 11 (2011) 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-7>.
- [68] J. Popko, C. Herrfurth, K. Feussner, T. Ischebeck, T. Iven, R. Haslam, M. Hamilton, O. Sayanova, J. Napier, I. Khozin-Goldberg, I. Feussner, Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricorutum*, *PLoS ONE.* 11 (2016) e0164673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164673>.
- [69] M. Matthijs, M. Fabris, S. Broos, W. Vyverman, A. Goossens, Profiling of the early nitrogen stress response in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* reveals a novel family of RING-domain transcription factors, *Plant Physiol.* 170 (2016) 489–498. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01300>.
- [70] F. Ge, W. Huang, Z. Chen, C. Zhang, Q. Xiong, C. Bowler, J. Yang, J. Xu, H. Hu, Methylcrotonyl-CoA carboxylase regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Plant Cell.* 26 (2014) 1681–1697. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124982>.
- [71] H. Abida, L.-J. Dolch, C. Me , V. Villanova, M. Conte, M.A. Block, G. Finazzi, O. Bastien, L. Tirichine, C. Bowler, F. Rébeillé, D. Petroustos, J. Jouhet, E. Maréchal, Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricorutum*, *Plant Physiol.* 167 (2015) 118–136. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252395>.
- [72] I.M. Remmers, D.E. Martens, R.H. Wijffels, P.P. Lamers, Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen starvation at different light intensities, *PLoS ONE.* 12 (2017) e0175630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175630>.
- [73] P. Heydarizadeh, W. Boureba, M. Zahedi, B. Huang, B. Moreau, E. Lukomska, A. Couzinet-Mossion, G. Wielgosz-Collin, V. Martin-J z quel, G. Bougaran, J. Marchand, B. Schoefs, Response of CO₂-starved diatom *Phaeodactylum tricorutum* to light intensity transition, *Phil. Trans. R. Soc. B.* 372 (2017) 20160396. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0396>.
- [74] Y. Tapania, A.K. Dolui, S. Boussiba, I. Khozin-Goldberg, Multiplexed genome editing via an RNA polymerase II promoter-driven sgRNA array in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*: insights into the role of StLDP, *Front. Plant Sci.* 12 (2022) 784780. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.784780>.
- [75] A.V. Nguyen, S.R. Thomas-Hall, A. Malno , M. Timmins, J.H. Mussgnug, J. Rupprecht, O. Kruse, B. Hankamer, P.M. Schenk, Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot. Cell.* 7 (2008) 1965–1979. <https://doi.org/10.1128/EC.00418-07>.
- [76] T. Huang, Y. Pan, E. Maréchal, H. Hu, Proteomes reveal the lipid metabolic network in the complex plastid of *Phaeodactylum tricorutum*, *Plant J.* (2023) tpj.16477. <https://doi.org/10.1111/tpj.16477>.
- [77] K. Yoneda, R. Oishi, M. Yoshida, Y. Matsuda, I. Suzuki, Stramenopile-type lipid droplet protein functions as a lipid droplet scaffold protein in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Plant Cell Physiol.* 64 (2023) 803–813. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad040>.

3.3 – Matériel supplémentaire

Le matériel supplémentaire comporte 8 tables numérotées (S1 à S8). La Table S1 est identique au Tableau VI de ce manuscrit de thèse présentée dans la section Matériel et Méthodes (section II-5.3.1).

Table S2: Relative expression fold-change for each gene investigated in this report.

Gene	Abbr.	ID/Phat3	P1						P4											
			N starvation			N resupply			N starvation			N resupply								
			DT1/DO	RE	log2 p-value	h24/DT1	RE	log2 p-value	DT1/DO	RE	log2 p-value	h24/DT1	RE	log2 p-value						
Triacylglycerol metabolism and major lipid droplet genes																				
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	GPAT1	J54709	1.55	0.63	3.9E-02	0.33	-1.61	4.9E-05	0.51	-0.97	8.1E-04	2.31	1.21	1.0E-07	0.24	-2.08	3.7E-09	0.58	-0.79	1.4E-04
	GPAT2	J3262	1.14	0.19	4.8E-01	0.36	-1.47	5.6E-04	0.34	-1.57	4.0E-04	1.24	0.31	1.9E-03	0.47	-1.08	3.8E-08	0.59	-0.76	7.6E-05
	GPAT3	EG02461	0.90	-0.15	1.1E-01	0.94	-0.09	5.9E-01	0.93	-0.11	6.4E-01	0.99	-0.01	8.7E-01	0.88	-0.55	9.9E-06	0.91	-0.14	2.9E-02
Lyso-phosphatidic acid acyltransferase	LPAA1T1	J43099	0.46	-1.11	4.0E-06	3.12	1.64	1.3E-04	4.10	2.04	2.6E-02	0.39	-1.37	4.3E-05	3.56	1.83	3.2E-04	3.80	1.93	1.7E-04
	LPAA1T2	J1916	0.90	-0.15	9.1E-02	1.24	0.31	3.7E-03	1.14	0.19	4.5E-02	1.10	0.14	1.4E-01	0.99	-0.03	7.5E-01	1.00	0.00	9.1E-01
	LPAA1T3	J20460	0.62	-0.69	3.2E-04	1.00	0.01	9.7E-01	0.99	-0.02	8.4E-01	0.69	-0.77	2.4E-04	1.29	0.37	1.9E-02	1.58	0.66	8.2E-06
	LPAA1T4	J48640	0.89	-0.16	7.8E-02	1.12	0.17	1.6E-01	0.89	-0.16	3.9E-01	0.75	-0.41	6.2E-05	1.53	0.61	1.3E-03	2.49	1.32	3.3E-07
	LPAA1T5	J45551	4.31	2.11	3.8E-05	0.33	-1.59	3.8E-06	0.45	-1.15	1.6E-05	5.10	2.35	5.5E-09	0.28	-1.83	8.5E-11	0.26	-1.94	9.0E-11
	DGAT1	J9794	0.88	-0.56	1.1E-02	0.74	-0.44	9.4E-02	0.88	-0.18	5.0E-01	1.76	0.82	2.1E-05	0.40	-1.33	1.1E-07	0.85	-0.24	4.2E-02
	DGAT2A	J49462	0.29	-1.79	3.0E-06	2.16	1.11	9.2E-03	2.88	1.53	1.9E-03	0.32	-1.65	3.2E-07	1.95	0.97	3.5E-04	3.01	1.59	5.4E-05
	DGAT2B	J49544	0.87	-0.20	4.4E-01	0.74	-0.43	1.3E-01	0.65	-0.63	5.5E-02	1.28	0.36	1.5E-03	0.56	-0.83	1.7E-09	0.61	-0.72	9.2E-07
	DGAT2C	J31662	0.77	-0.37	3.4E-03	1.50	0.58	3.0E-03	1.48	0.56	6.0E-02	1.35	0.43	6.4E-03	0.94	-0.09	2.6E-01	1.13	0.18	3.8E-03
	DGAT2D	J43469	0.66	-0.24	2.0E-02	0.68	-0.55	2.7E-03	1.03	0.04	8.6E-01	0.91	-0.13	2.6E-01	0.66	-0.60	1.6E-04	1.92	0.94	3.9E-03
	DGAT2E	EG00369	0.64	-0.65	2.2E-05	1.03	0.04	5.8E-01	1.10	0.14	9.2E-02	0.62	-0.69	9.9E-03	0.81	-0.31	4.4E-02	1.81	0.85	1.2E-03
	DGAT3	J49708	1.01	0.01	9.4E-01	0.91	-0.14	5.9E-01	0.97	-0.04	6.9E-01	1.32	0.40	5.5E-02	0.65	-0.63	2.0E-06	1.30	0.37	4.7E-06
Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase	PDAT1	J8860	1.21	0.27	2.2E-01	0.39	-1.35	9.3E-06	1.00	0.00	8.9E-01	1.25	0.32	6.2E-03	0.32	-1.66	9.0E-09	0.91	-0.14	1.8E-01
	PDAT2	J49702	1.20	0.32	1.7E-01	0.42	-1.25	8.6E-05	0.85	-0.24	3.9E-01	1.39	0.47	2.4E-04	0.38	-1.41	3.3E-06	0.84	-0.25	5.9E-02
	Class 3 lipases																			
	CI3lip1	EG02610	1.20	0.27	1.1E-01	0.29	-1.80	6.3E-07	0.42	-1.27	2.7E-06	2.38	1.25	9.2E-04	0.14	-2.79	2.7E-05	0.60	-0.74	8.6E-04
	CI3lip2	J44028	0.75	-0.42	6.8E-02	0.21	-2.22	1.4E-06	0.83	-0.26	2.4E-01	0.79	-0.35	2.6E-02	0.47	-1.10	1.6E-05	1.74	0.80	6.0E-03
	CI3lip3	J41624	1.80	0.85	1.5E-03	0.19	-2.42	2.2E-06	0.52	-0.94	2.0E-03	1.24	0.31	1.8E-01	0.36	-1.48	3.7E-06	1.02	0.03	9.1E-01
	CI3lip4	J45660	0.91	-0.14	6.4E-01	1.31	0.39	6.0E-01	1.48	0.56	2.1E-01	1.21	0.27	1.2E-01	0.90	-0.16	2.0E-01	1.47	0.55	2.1E-02
o/b hydrolases lipases																				
	ABi1p1	J54974	1.34	0.42	1.2E-01	0.31	-1.69	3.2E-05	0.37	-1.44	6.5E-06	1.04	0.05	7.0E-01	0.50	-0.99	3.3E-06	0.83	-0.28	1.3E-02
	ABi1p2	EG02408	0.19	-2.36	1.3E-05	6.49	2.70	9.4E-07	0.51	-0.98	2.7E-05	0.09	-3.46	1.2E-04	11.91	3.67	2.2E-06	0.87	-0.21	3.0E-01
	ABi1p3	J11048	1.01	0.01	9.3E-01	1.08	0.12	6.0E-01	0.85	-0.24	3.1E-01	0.89	-0.17	2.1E-01	0.84	-0.28	9.2E-02	1.33	0.42	8.5E-02
GDSL lipase	GDSLip1	EG02330	1.92	0.94	4.2E-02	0.45	-1.15	7.1E-02	0.77	-0.38	3.1E-01	2.06	1.04	1.4E-05	0.37	-1.44	1.1E-08	0.59	-0.75	1.4E-06
Patatin-like lipase	PLP1p1	EG000720	0.44	-1.18	1.3E-04	1.18	0.23	4.1E-01	1.38	0.47	1.7E-01	0.17	-2.55	4.0E-08	3.78	1.92	8.0E-07	3.40	1.77	1.9E-03
Strainopile LD protein	SILDp1	J48899	0.95	-0.07	4.4E-01	0.51	-0.96	3.2E-04	0.95	-0.07	7.2E-01	1.72	0.78	1.1E-05	0.32	-1.62	1.9E-07	0.72	-0.48	2.4E-03
<i>P. tricornutum</i> LD protein	PLDp1	J44488	0.27	-1.89	3.3E-07	1.69	0.76	1.5E-02	0.62	-0.68	1.5E-04	0.37	-1.43	2.5E-09	4.30	2.10	3.7E-04	1.15	0.20	2.9E-01
Chrysolaminarin metabolism genes																				
UDP-glucose pyrophosphorylase	UGP1	EG02613	0.80	-0.31	2.5E-01	0.72	-0.47	1.6E-01	1.13	0.18	7.2E-01	1.03	0.05	6.9E-01	0.49	-1.04	3.7E-03	1.06	0.09	5.4E-01
	UGP2	J23639	0.56	-0.83	5.9E-03	1.24	0.31	4.6E-01	1.29	0.37	5.2E-01	0.49	-1.04	2.0E-04	1.35	0.43	2.2E-03	1.49	0.57	1.3E-03
β-1,3- glucan synthase	BS1	J9617	0.83	-0.28	2.2E-01	0.91	-0.13	4.5E-01	1.00	0.00	8.9E-01	0.62	-0.70	7.5E-05	1.13	0.18	1.2E-02	1.39	0.47	1.2E-02
β-1,6- Transglucosylase	TG51	J50238	0.79	-0.34	1.3E-01	0.80	-0.13	6.5E-03	0.64	-0.63	1.5E-04	0.79	-0.33	2.1E-02	0.96	-0.05	3.3E-01	1.19	0.25	2.0E-03
Endo-β- glucosidase	Endo61	EG02526	0.54	-0.88	8.4E-06	0.81	-0.30	1.6E-03	1.16	0.22	5.9E-02	1.14	0.20	2.1E-01	1.02	0.04	4.5E-01	1.13	0.18	7.6E-02
	Endo62	J54973	0.15	-2.72	2.9E-09	0.90	-0.15	1.7E-01	1.15	0.20	3.0E-01	0.48	-1.06	3.0E-09	0.88	-1.06	3.0E-09	0.86	-0.21	8.8E-02
	Endo63	J52685	2.44	1.23	6.1E-04	0.10	-3.34	7.9E-07	0.16	2.67	4.9E-08	0.69	-0.16	4.3E-02	0.28	-1.82	8.5E-02	0.54	-0.81	3.5E-07
	Exo61	J1372	1.04	0.06	5.8E-01	0.71	-0.49	7.6E-03	0.53	-0.90	7.1E-06	3.34	1.74	9.3E-03	0.61	-0.72	8.5E-02	0.75	-0.42	2.3E-01
	Exo62	J45418	0.55	-0.87	1.7E-05	0.56	-1.46	3.3E-06	0.96	-0.06	4.6E-01	0.77	-0.38	1.6E-01	0.34	-1.56	8.1E-03	1.07	0.33	4.3E-01
	Exo63	J49610	0.95	-0.07	3.0E-01	0.57	-0.62	6.2E-05	0.56	-0.85	1.6E-04	0.90	-0.16	9.6E-02	0.84	-0.24	1.7E-04	1.07	0.09	3.0E-01
	Exo64	J54569	1.29	0.37	9.9E-02	0.18	-2.50	4.7E-05	0.58	-0.79	7.9E-04	0.97	-0.06	2.5E-01	0.27	-1.91	9.6E-10	1.64	0.71	2.0E-02
	Exo65	J43302	0.10	-3.95	8.3E-07	3.70	1.89	9.5E-08	7.76	2.96	7.4E-07	0.38	-1.38	1.7E-06	2.07	1.05	4.1E-05	2.99	1.59	8.9E-05

Table S3: Evolution of the fatty acid profile of Pt1 and Pt4 total lipids during the nitrogen deficiency experiment of 15 days. Values are in molar % ($M \pm SD$, $n=3$). Letters represent significant variations with $a>b>c>d$ for Pt1 and $a'>b'>c'>d'$ for Pt4 (ANOVA and Fisher LSD post-hoc test, p -value < 0.05).

Fatty Acid	Pt1					Pt4				
	D0	D3	D7	D11	D15	D0	D3	D7	D11	D15
C14:0	3.7 ± 0.1	2.6 ± 0.4	2.7 ± 0.3	2.9 ± 0.5	3.2 ± 0.3	2.5 ± 0.3	4.2 ± 0.8	4.4 ± 0.3	4.1 ± 0.6	2.9 ± 1.4
C16:0	17.1 ± 0.2 ^b	28.5 ± 0.5 ^a	29.0 ± 0.5 ^a	28.3 ± 0.1 ^a	29.0 ± 0.2 ^a	14.7 ± 1.4 ^{d'}	24.5 ± 0.8 ^{c'}	27.6 ± 0.7 ^{b'}	28.3 ± 1.0 ^{ab'}	30.2 ± 1.4 ^{a'}
C16:1	22.9 ± 1 ^d	38.3 ± 2.2 ^c	43.1 ± 0.7 ^b	43.1 ± 2.7 ^b	47.6 ± 0.7 ^a	16.8 ± 1.1 ^{c'}	34.8 ± 0.4 ^{b'}	41.8 ± 0.4 ^{a'}	43.1 ± 0.2 ^{a'}	41.4 ± 2.9 ^{a'}
C16:2	3.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	2.5 ± 0.5	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0
C16:3	4.5 ± 0.9	2.5 ± 0.3	1.7 ± 0.0	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1
C18:0	1.6 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.2 ± 0.5	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	2.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.0	1.3 ± 0.3
C18:1	2.5 ± 0.5	3.9 ± 3.8	2.4 ± 0.5	5.4 ± 2.8	2.0 ± 0.4	6.4 ± 1.1	4.6 ± 0.1	6.1 ± 0.2	6.9 ± 0.7	7.8 ± 1.1
C18:2	1.7 ± 0.1	2.6 ± 0.5	2.2 ± 0.6	3.5 ± 1.8	1.3 ± 0.1	2.2 ± 0.4	2.1 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.1
C18:3	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.7 ± 0.1	2.0 ± 0.2
C18:4	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
C20:4	4.5 ± 0.4	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.2	2.3 ± 0.4	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2
C20:5	19.8 ± 0.2 ^a	12.8 ± 1.1 ^b	10.8 ± 0.3 ^c	8.9 ± 0.8 ^d	9.3 ± 0.5 ^d	26.6 ± 4.0 ^{a'}	13.3 ± 0.3 ^{b'}	7.9 ± 0.3 ^{c'}	6.8 ± 0.5 ^{c'}	6.8 ± 1.0 ^{c'}
C22:6	9.5 ± 2.3 ^a	1.7 ± 0.7 ^b	1.4 ± 0.1 ^b	1.1 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.2 ^b	10.9 ± 3.5 ^{a'}	4.3 ± 0.3 ^{b'}	2.0 ± 0.3 ^{b'}	1.6 ± 0.1 ^{b'}	1.5 ± 0.2 ^{b'}
C24:0	2.6 ± 0.7	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.2

Table S4: Evolution of the fatty acid profile of Pt1 and Pt4 neutral lipids during the nitrogen deficiency experiment of 15 days. Values are in molar % ($M \pm SD$, $n=3$). Letters represent significant variations with $a>b>c>d$ for Pt1 and $a'>b'>c'>d'$ for Pt4 (ANOVA and Fisher LSD post-hoc test, p -value < 0.05).

Fatty Acid	Pt1					Pt4				
	D0	D3	D7	D11	D15	D0	D3	D7	D11	D15
C14:0	2.5 ± 0.7	2.3 ± 1.1	2.1 ± 0.0	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.5	2.1 ± 0.5 ^{c'}	4.3 ± 0.5 ^{a'}	2.4 ± 0.1 ^{c'}	2.8 ± 0.2 ^{b'c'}	3.4 ± 0.8 ^{b'}
C16:0	27.3 ± 2.1 ^c	32.6 ± 0.8 ^a	31 ± 0.1 ^{ab}	30.5 ± 0.3 ^b	30.7 ± 0.3 ^{ab}	27.5 ± 4.2	30.4 ± 0.7	31.0 ± 0.6	31.0 ± 0.8	31.5 ± 0.8
C16:1	29.6 ± 1.6 ^c	46.3 ± 2.2 ^b	48.2 ± 0.4 ^{ab}	50.0 ± 0.6 ^a	50.1 ± 0.7 ^a	18.9 ± 6.3 ^{b'}	43.5 ± 0.6 ^{a'}	44.6 ± 0.7 ^{a'}	45.9 ± 0.0 ^{a'}	46.5 ± 0.4 ^{a'}
C16:2	8.8 ± 0.7 ^a	1.7 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.0 ^{bc}	1.0 ± 0.1 ^c	0.8 ± 0.1 ^c	8.3 ± 3.0 ^{a'}	2.3 ± 0.3 ^{b'}	1.2 ± 0.1 ^{b'}	0.8 ± 0.1 ^{b'}	0.7 ± 0.1 ^{b'}
C16:3	2.3 ± 0.4 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.0 ^{bc}	1.2 ± 0.0 ^c	5.2 ± 0.4 ^{a'}	2.1 ± 0.2 ^{b'}	1.0 ± 0.1 ^{c'}	0.8 ± 0.1 ^{c'}	0.7 ± 0.1 ^{c'}
C18:0	3.3 ± 1.0 ^a	0.9 ± 0.2 ^b	0.8 ± 0.2 ^b	0.5 ± 0.0 ^b	0.7 ± 0.1 ^b	4.1 ± 1.5 ^{a'}	1.2 ± 0.4 ^{b'}	1.0 ± 0.1 ^{b'}	0.9 ± 0.1 ^{b'}	0.8 ± 0.2 ^{b'}
C18:1	4.4 ± 0.2 ^a	2.4 ± 1.0 ^b	2.6 ± 0.1 ^b	2.3 ± 0.2 ^b	2.4 ± 0.1 ^b	11.3 ± 7.4	4.3 ± 0.1	7.1 ± 0.3	7.1 ± 0.4	7.1 ± 0.4
C18:2	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	3.7 ± 1.1 ^{a'}	0.8 ± 0.1 ^{b'}	1.0 ± 0.3 ^{b'}	0.7 ± 0.0 ^{b'}	0.7 ± 0.0 ^{b'}
C18:3	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.1 ^{e'}	0.8 ± 0.0 ^{d'}	1.2 ± 0.0 ^{c'}	1.4 ± 0.0 ^{b'}	1.5 ± 0.0 ^{a'}
C18:4	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
C20:4	9.0 ± 5.8 ^a	0.5 ± 0.1 ^b	0.5 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.1 ^b	9.0 ± 8.0	1.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.5	0.9 ± 0.0
C20:5	7.0 ± 0.8	7.5 ± 1.4	8.2 ± 0.1	8.0 ± 0.5	8.0 ± 0.7	4.8 ± 1.0 ^{b'c'}	6.3 ± 0.1 ^{a'}	6.4 ± 0.4 ^{a'}	5.6 ± 0.3 ^{ab'}	4.6 ± 0.1 ^{c'}
C22:6	2.0 ± 0.3 ^a	0.8 ± 0.2 ^b	0.7 ± 0.0 ^b	0.7 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.1 ^b	3.1 ± 1.1 ^{a'}	0.6 ± 0.0 ^{b'}	0.8 ± 0.1 ^{b'}	0.7 ± 0.1 ^{b'}	0.6 ± 0.0 ^{b'}
C24:0	0.5 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^b	n.d.	0.4 ± 0.0 ^{a'}	0.3 ± 0.0 ^{ab'}	0.3 ± 0.0 ^{b'c'}	0.2 ± 0.0 ^{c'}

n.d.: not detected

Table S5 and S6: Evolution of the fatty acid profile of Pt1 total lipids (S5) and neutral lipids (S6) during the resupply experiments. Values are molar % ($M \pm SD$, $n=3$).

Fatty Acid	Pt1													
	N ₀		N+C+			N-C-			N-C+			N-C-		
	D11	h12	h24	h72	h12	h24	h72	h12	h24	h72	h12	h24	h72	
C14:0	2±0.2	2.4±0.2	2.3±0.2	0.9±0.1	2.4±0.5	2.4±0.6	1±0.3	2.1±0.3	2.2±0.1	0.9±0.1	2.5±0.3	2.3±0.3	0.7±0.1	
C16:0	28.4±0.3	28.7±0.1	27.9±0.4	21.4±0.8	27.9±0.2	27.9±1.3	19.5±1.1	28.7±0.3	28.9±0.2	29.9±0.6	29.4±0.9	29.4±0.5	29.1±0.1	
C16:1	45±0.4	46.7±0	46.1±0.5	31.9±0.4	45.6±0.7	43.5±2.2	30.2±2.6	46±0.3	47.2±0.4	44.9±1.1	46.4±0.5	47.7±0.1	41.5±1.1	
C16:2	1.1±0.1	0.9±0	1±0	2.5±0.1	0.9±0	1±0.1	2.5±0.1	0.9±0	0.9±0	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0	1±0	
C16:3	0.9±0	1.1±0.1	1.2±0	2.6±0.2	1.2±0.1	1.2±0.1	2.4±0.1	1.1±0.1	0.9±0	0.8±0	1±0.1	0.9±0	0.8±0	
C18:0	0.6±0	0.7±0	0.6±0.1	0.8±0.1	0.6±0	1.6±1.7	0.8±0.1	0.7±0.1	0.6±0	0.7±0	1.1±0.8	0.6±0	0.8±0	
C18:1	2.8±0.1	2.6±0	2.6±0.2	3±0.2	2.6±0.1	2.8±0.1	2.9±0.2	2.7±0.1	2.6±0	3.1±0.1	2.7±0.1	2.6±0.1	3.4±0.1	
C18:2	1.5±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1	1.6±0.5	1.5±0.2	1.4±0.1	1.4±0.1	1.2±0	1.4±0.1	1.2±0	1.9±0.1	
C18:3	0.4±0	0.4±0	0.4±0	0.2±0	0.4±0	0.3±0.1	0.3±0	0.4±0	0.4±0	0.4±0	0.5±0.2	0.4±0	0.5±0	
C18:4	0.5±0	0.3±0	0.3±0.1	0.3±0	0.5±0	0.5±0.2	0.4±0	0.4±0.1	0.2±0	0.2±0	0.3±0.1	0.2±0	0.3±0	
C20:4	2.3±0.2	1±0.1	1.3±0.2	0.7±0.2	1±0.1	1.3±0.7	0.8±0.1	1.1±0.1	1.1±0	1±0	1.1±0.2	1±0	1.5±0.1	
C20:5	11.3±0.4	10.7±0.6	11.4±0.3	22.4±0.9	11.9±0.6	11.7±1.4	26.1±2.9	11.1±0.4	10.4±0.5	12.3±1	9.8±0.6	9.8±0.1	14±0.6	
C22:6	1.1±0	1±0	1.2±0	6±0.5	1.1±0.1	1.7±0.1	4.9±0.6	1.2±0.3	1±0	1.7±0.4	1.2±0.2	1.2±0	2.1±0.2	
C24:0	1.1±0.1	0.9±0	0.9±0	2.7±0.3	1.1±0.2	0.9±0	3±0.3	1±0	0.9±0	1±0.1	0.8±0.5	0.8±0.1	1.6±0.1	

Fatty Acid	Pt1													
	N ₀		N+C+			N-C-			N-C+			N-C-		
	D11	h12	h24	h72	h12	h24	h72	h12	h24	h72	h12	h24	h72	
C14:0	2.1±0.5	2.5±0.1	2±0.1	1.1±0.1	2.5±0.2	2.4±0.6	1.9±0.7	2.4±0	1.8±0.2	1.7±0.2	2.5±0.3	2.1±0.2	1.3±0.2	
C16:0	30.1±0.4	29.6±0	29.5±0.8	29.1±0.6	27.9±0.1	27.9±1.3	28.1±1.3	30±0.2	30.6±0.5	30.7±0.6	30.1±0.5	30.6±0.4	31.3±0.2	
C16:1	47.5±0.7	50.1±0.3	49.9±0.4	45.3±1.1	49.5±0.1	43.5±2.2	45.3±1.8	50.1±0.3	49.5±0.3	49.2±0.6	50.1±0.1	49.9±0.1	49.1±0.3	
C16:2	1.1±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	4.1±0.3	1.1±0.1	1±0.1	4.4±0.5	1.1±0	1±0	0.9±0.1	1±0	0.9±0	1.1±0.1	
C16:3	1.7±1.1	1.1±0.1	1±0.1	1.6±0.1	1.1±0	1.2±0.1	1.6±0.4	1.2±0.3	0.9±0.1	1±0.1	1.1±0.1	0.9±0	0.9±0	
C18:0	1.1±0.9	0.6±0	0.6±0	1.2±0.1	0.6±0.1	1.6±1.7	0.9±0.1	0.6±0	0.6±0	0.8±0.4	0.5±0.1	0.6±0	0.6±0	
C18:1	2.7±0.2	2.5±0	2.7±0.2	4.1±0.4	2.5±0.1	2.8±0.1	4±0.4	2.6±0	2.8±0.1	3±0.2	2.5±0.1	2.7±0	2.9±0.1	
C18:2	1±0.1	1.1±0.1	1±0.1	0.9±0.2	1±0	1.6±0.5	1.2±0.4	1.1±0	1.1±0.1	1±0.1	1.1±0	1±0.1	1.1±0	
C18:3	0.4±0.1	0.3±0	0.4±0	0.3±0	0.4±0	0.3±0.1	0.4±0	0.3±0	0.3±0	0.5±0.2	0.3±0	0.3±0	0.4±0.1	
C18:4	0.4±0	0.2±0	0.2±0	0.2±0	0.3±0	0.5±0.2	0.2±0	0.2±0.1	0.2±0	0.3±0.2	0.2±0	0.2±0	0.2±0	
C20:4	1.5±0.8	0.7±0	0.6±0	0.6±0.1	0.7±0	1.3±0.7	0.6±0.2	0.6±0	0.6±0	0.7±0	0.7±0	0.6±0	0.7±0	
C20:5	8.5±1.7	8.6±0.5	8.8±1	8.5±0.4	9±0.3	11.7±1.4	8.5±0.3	8.1±0.5	8.7±0.4	8.4±1.7	8±0	8.4±0.1	8.5±0.6	
C22:6	1±0.5	0.6±0	1±0	1.4±0.1	0.7±0	1.7±0.1	1.9±0.5	0.6±0	0.8±0.2	0.9±0.2	0.6±0	0.8±0.1	1±0	
C24:0	0.1±0	0.1±0	0.2±0	0.4±0	0.2±0	0.9±0	0.4±0	0.2±0	0.2±0	0.2±0	0.1±0	0.1±0	0.2±0	

Table S7 and S8: Evolution of the fatty acid profile of Pt4 total lipids (S7) and neutral lipids (S8) during the resupply experiments. Values are molar % ($M \pm SD$, $n=3$).

Fatty Acid	Pt4												
	N+C+			N-C-			N-C+			N-C-			
	h12	h24	h72	h12	h24	h72	h12	h24	h72	h12	h24	h72	
S7													
Pt4													
	No	N+C+			N-C-			N-C+			N-C-		
C14:0	3.1±1.6	2±0.8	3.3±0.2	2.6±0.2	4.2±1.1	2.3±0.6	2.3±1.1	3.5±1.5	3.1±0.4	1.5±0.3	3.8±0.3	4.5±0.9	2.2±0.7
C16:0	25.3±0.8	24.9±0.7	20.4±0.5	17.1±0.1	24.6±0.2	20±0.2	15.8±0.3	27.1±0.4	25.8±0.4	27±0.7	26.9±0.5	25.8±0.3	26.7±0.6
C16:1	34.9±2.3	35.2±1.6	31.5±0.4	25.4±0.5	38.5±1.1	30±0.8	23.5±2	38.7±2	36.6±0.9	34.2±1.7	38.7±0.3	37.6±0.9	35.1±1.5
C16:2	1.4±0.2	1.5±0.1	1.9±0.1	2.6±0.2	1.5±0.1	2.1±0.1	3.1±0.1	1.4±0.2	1.6±0.2	1.5±0.1	1.5±0.1	1.6±0.2	1.6±0.1
C16:3	1±0.2	1.3±0.1	2±0.1	2.5±0.1	1.4±0.1	1.9±0	2.7±0.2	1.1±0.1	1±0	1±0.1	1.2±0.1	1±0.1	0.9±0.1
C18:0	1±0.2	1±0.1	0.9±0.1	0.6±0	0.9±0.2	0.9±0.1	0.7±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	1.1±0.1	0.8±0	0.8±0.1	1±0.1
C18:1	5.2±0.7	6.5±0.6	5.6±0.3	3.7±0.1	5.6±0.2	6.3±0.2	3.5±0.2	5.1±0.6	4.9±0.2	6.3±0.3	5±0.3	4.8±0.5	5.8±0.5
C18:2	2.1±0.3	2±0.2	1.8±0.2	2.7±0.3	1.6±0.1	2±0.1	1.9±0.3	1.8±0.2	2.2±0	2.3±0.1	1.8±0.1	1.7±0.1	2.3±0.3
C18:3	1.8±0.2	1.8±0.1	1.5±0	1±0	1.6±0.1	1.7±0.1	0.8±0.1	1.7±0.2	1.8±0	2.1±0.1	1.7±0.1	1.7±0.1	2±0.2
C18:4	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.2±0	0.1±0	0±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0
C20:4	3.8±1.6	1.6±0.1	2.7±0.6	1.2±0	1.3±0.1	2±0.2	1.3±0.2	1.4±0.1	2.1±0.2	1.8±0.2	1.3±0.1	1.5±0.1	1.6±0.2
C20:5	12±2.4	13.5±1.2	15.9±0.9	23.9±0.7	11.1±1.1	18.4±1	25.4±2.2	10.7±1.6	11.9±0.3	13.4±1	10.4±0.2	11.8±1.1	12.3±0.9
C22:6	4.1±1.9	4.5±0.7	5.8±0.7	8.1±0.2	3.1±0.1	6±0.4	9.4±0.9	3.1±0.5	3.6±0.7	3.7±0.4	2.9±0.4	2.8±0.1	4.2±0.7
C24:0	2±0.4	1.7±0.2	2±0.2	2.7±0.1	1.3±0.3	2.3±0.1	3±0.3	1.5±0.3	2.1±0.2	2.4±0.6	1.6±0.2	1.9±0.1	2.2±0.1
S8													
Pt4													
	No	N+C+			N-C-			N-C+			N-C-		
Fatty Acid	D11	h12	h24	h72	h12	h24	h72	h12	h24	h72	h12	h24	h72
C14:0	4±0.3	3.9±0.3	1.8±0.6	3±0.8	4.2±0.2	2.3±1.1	4.4±1.6	4.1±0	1.8±0.4	2.6±0.2	4±0.3	2.6±0.5	3.1±1
C16:0	27.5±0.5	28.6±1.4	24.7±0.1	30.2±0.5	27.9±1	24.7±1.1	29.1±2.4	30.6±0.7	30.8±0.4	31±0.1	30.5±0.2	31.3±0.4	31±0.1
C16:1	40.4±0.8	43±2.1	38.7±2.5	31.6±3.1	42.9±2.3	37.9±0.2	23±1	44.8±1.2	41.5±0.3	43±0.6	43±2	41.2±1.6	42.1±0.5
C16:2	2.2±0.6	2.6±1.3	2.9±0.8	8.9±1.8	3.4±2.3	4.3±0.9	14.3±1	2.2±0.7	2.7±0.5	2.2±0.3	2.7±1	3.2±1.4	2.3±0.2
C16:3	1.8±0.8	1±0.2	1.5±0.2	1.3±0.1	1.3±0.4	1.4±0	1.9±0.2	1±0.1	1±0	1.1±0.1	1.1±0	1±0.1	1.1±0.1
C18:0	0.8±0	1±0.2	1.1±0.2	1.3±0.2	1±0.3	1.1±0	0.5±0	0.8±0.1	1±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	0.3±0.1	1±0.1
C18:1	5.2±0.2	7.1±0.6	9.8±0.6	6.5±0.6	6.9±0.3	9.9±0.3	8±0.5	5.5±0.3	6.6±0.4	6.2±0.2	5.8±0.3	7.1±0.8	6.3±0.5
C18:2	0.7±0	1.2±0.2	1±0.1	0.9±0	1.2±0.5	1±0.1	0.6±0.1	0.9±0.1	1±0.1	0.8±0	0.8±0	0.9±0	0.8±0.1
C18:3	1.1±0.1	1.5±0.1	2.3±0.1	0.9±0	1.6±0.1	2.2±0.3	1.1±0.2	1.2±0	1.5±0.1	1.4±0	1.2±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1
C18:4	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0.1±0	0.1±0	0±0	0.1±0	0.1±0	0±0	0.1±0	0.1±0
C20:4	5.8±3.4	0.8±0.1	1.2±0.1	0.5±0.2	0.7±0.1	1.1±0	0.7±0.1	0.6±0.1	0.8±0.1	0.7±0	0.6±0.1	0.7±0	0.8±0.1
C20:5	7.9±1.6	6.8±0.8	10.8±1.4	10±3.3	6.4±1.5	10±2.1	10.8±4.9	6.1±0.5	8.8±0.3	7.6±0.2	7.1±1.3	7.3±1	7.4±0.7
C22:6	1.2±0.2	1.1±0.4	2.4±0.2	3.1±0.2	1.1±0	2.2±0.2	3.7±0.9	0.8±0.1	1.1±0.1	1.1±0	0.8±0	1±0.1	1.2±0.1
C24:0	0.1±0	0.2±0	0.3±0	0.3±0	0.2±0.1	0.3±0	0.5±0.1	0.1±0	0.2±0	0.2±0	0.2±0.1	0.3±0.1	0.2±0

**4 – Approche de traitement pharmacologique par deux inhibiteurs de la
dégradation des lipides**

4.1 – Contexte et conception de l'expérience

Afin d'explorer plus avant les rôles de la dégradation des lipides dans la réponse à une carence et une resupplémentation en azote, nous avons mis en place des expériences préliminaires d'exposition de *P. tricornutum* à des inhibiteurs de la lipolyse et de la lipophagie. Ce type d'approches utilisant de petites molécules ayant un effet pharmacologique connu est un outil intéressant pour la compréhension des processus métaboliques. En effet, il permet une inhibition de voies métaboliques spécifiques sans transformation génétique. L'hypothèse de travail sous-jacente à ces approches est de supposer que les inhibiteurs ayant une fonction biologique caractérisée, en général chez les mammifères, ont la même fonction chez les microalgues. Pour le cas des diatomées, cette hypothèse a déjà été vérifiée pour des inhibiteurs du cycle cellulaire (Kim et al., 2017), de la voie de synthèse des stérols (Conte et al., 2018), ou de différents mécanismes impliqués dans l'autophagie (Nonoyama et al., 2019).

L'objectif de cette approche est de quantifier l'importance respective des deux voies de dégradation des lipides, lipolyse et lipophagie, chez *P. tricornutum*. Plusieurs sous-questions peuvent être dégagées : (1) pendant la carence en azote, y a-t-il simplement une augmentation des voies de synthèse ou bien également une inactivation des voies de dégradation ? ; (2) après resupplémentation, quelle est l'importance de la lipolyse et de la lipophagie ? ; (3) si les voies de dégradation des lipides sont inactivées, est-ce que les cellules se reportent sur une autre source d'énergie (glucides par exemple) ?

Pour répondre à ces différentes questions, des molécules à tester ont d'abord été sélectionnées. Pour la lipolyse, le choix s'est porté sur l'ATGlistatine, inhibiteur de l'*adipose triglyceride lipase*, principale TG lipase des mammifères. Cet inhibiteur n'a jamais été testé chez les microalgues, mais a précédemment été mentionné comme molécule à tester pour augmenter l'accumulation de lipides chez les microalgues (Sun et al., 2019). Pour la lipophagie, le choix s'est porté sur la chloroquine, inhibiteur de l'autophagie qui fait augmenter le pH des compartiments acides, incluant les vacuoles et lysosomes. Cet inhibiteur a déjà été testé à une concentration de 5 μM lors d'une resupplémentation chez les diatomées *F. solaris* et *P. tricornutum* Pt1, avec pour résultat une diminution de la consommation des lipides suivie par la taille des LD (Nonoyama et al., 2019).

La démarche expérimentale générale a ensuite été de déterminer une dose de traitement non-toxique pour les microalgues. Pour ce faire, les diatomées cultivées en microplaques 12 puits ont été exposées à une gamme de 9 concentrations (de 0.25 μM à 100 μM) (**section 4.1**). Ensuite, la dose considérée comme non-toxique a été apportée à des cultures de Pt1 et Pt4 pendant une expérience de carence azotée (11 jours, prélèvements à J0, J7 et J11) suivie

d'une sortie de carence (72 heures, prélèvement à h72) (**section 4.3**). Les prélèvements ont servi à doser les lipides neutres, les glucides solubles et les protéines solubles.

Le traitement a été ajouté à deux instants : au moment de la mise en carence (C) pour tester l'effet de l'inhibition de ces voies pendant la carence et au moment de la resupplémentation (S) pour tester un éventuel effet sur la consommation des lipides (**Figure 49**).

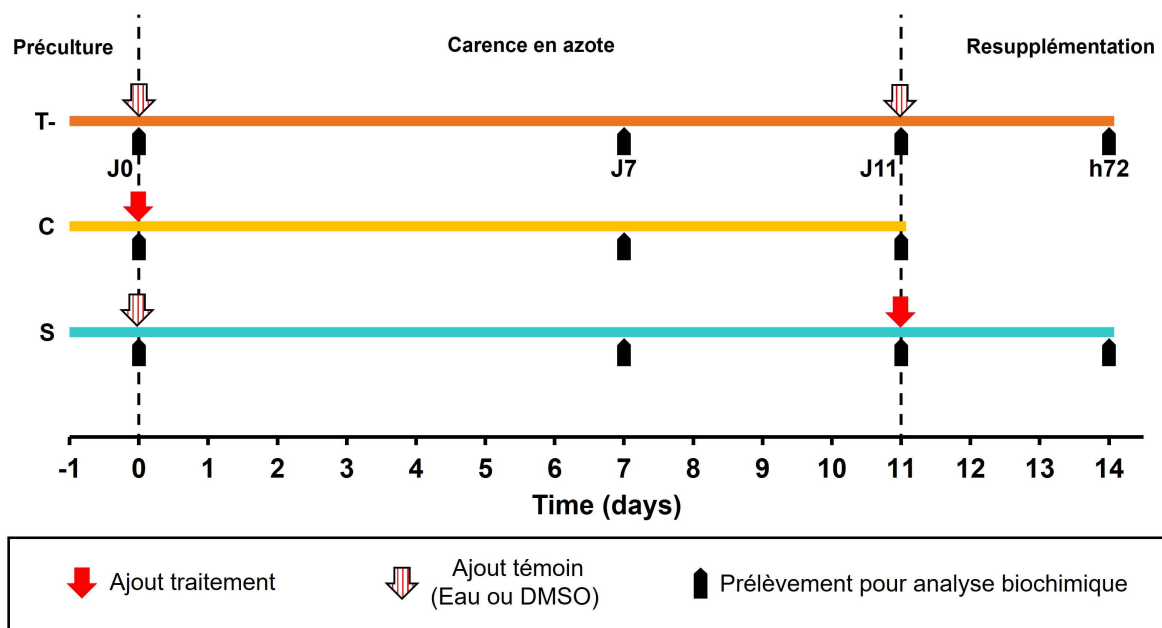


Figure 49 : Chronogramme des différentes conditions de traitement.

4.2 – Détermination de la dose non-toxique

Afin de déterminer la concentration à utiliser pour le traitement des cultures, les effets d'une gamme de concentration de chaque inhibiteur sur la croissance cellulaire ont d'abord été évalués (**Figure 50**). L'objectif est de déterminer une concentration n'induisant pas une toxicité pour les microalgues afin de pouvoir observer un éventuel effet métabolique.

Les résultats obtenus montrent que pour chacune des deux molécules, il y a une dose à partir de laquelle la croissance est inhibée. Pour la chloroquine (**Figure 50A et C**), il s'agit pour Pt1 et Pt4 de la dose de 6 μM . L'effet est très marqué chez Pt4 où cette concentration empêche totalement la croissance tandis qu'elle la réduit chez Pt1. Les expériences ultérieures ont donc conduites à une concentration de 3 μM chez les deux souches.

Pour l'ATGlistatine (**Figure 50B et D**), les résultats sont moins clairs que pour la chloroquine, mais permettent d'identifier une concentration pour le traitement de 3 μM pour Pt1 et 0.5 μM pour Pt4.

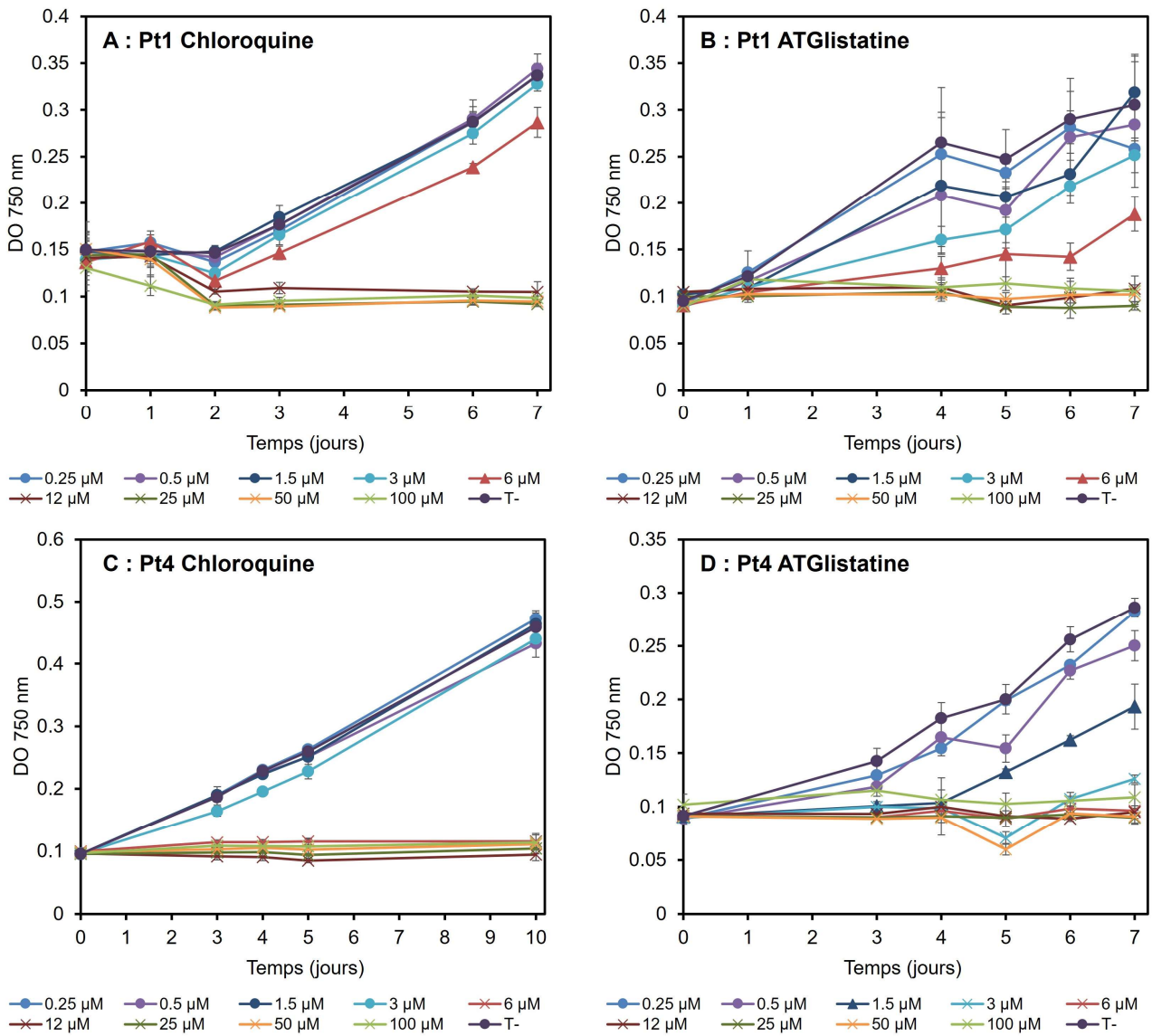


Figure 50 : Effets d'une gamme de concentrations de chloroquine (A et C) et d'ATGlistatine (B et D). Les symboles correspondent aux effets identifiés de la dose considérée : points : témoin et croissances similaires ; triangles : inhibition partielle de la croissance ; croix : inhibition complète de la croissance.

4.3 – Traitements pendant une carence suivie d'une resupplémentation

4.3.1 – Effets de la chloroquine

Les effets des traitements par la chloroquine au cours de la carence et de la resupplémentation sont présentés dans la **Figure 51**.

Aucune différence dans la croissance n'a été observée pour la chloroquine entre le témoin et les conditions traitées (**Figure 51A et B**), que ce soit en carence ou en resupplémentation, suggérant une absence d'effet sur les divisions cellulaires comme attendu à cette dose.

Les effets sur les paramètres biochimiques suivis sont présentés dans les **Figures 51C à H**. Chez Pt1 le traitement à la chloroquine pendant la carence en azote montre une accumulation des lipides neutres et une diminution des glucides solubles à J11 et J7 respectivement (**Figure 51C et E**). Les tendances (non significatives) sont les mêmes chez Pt4 (**Figure 51D et F**). Si la chloroquine inhibe effectivement la lipophagie comme précédemment suggéré (Nonoyama et al., 2019), l'augmentation du contenu en lipides avec traitement pendant la carence semble indiquer que la lipophagie est active en carence et permet probablement d'assurer les fonctions cellulaires minimales dans ces conditions. L'accumulation moindre de glucides en présence du traitement pourrait indiquer l'utilisation de cette source alternative de carbone lorsque la dégradation des lipides par lipophagie est inhibée.

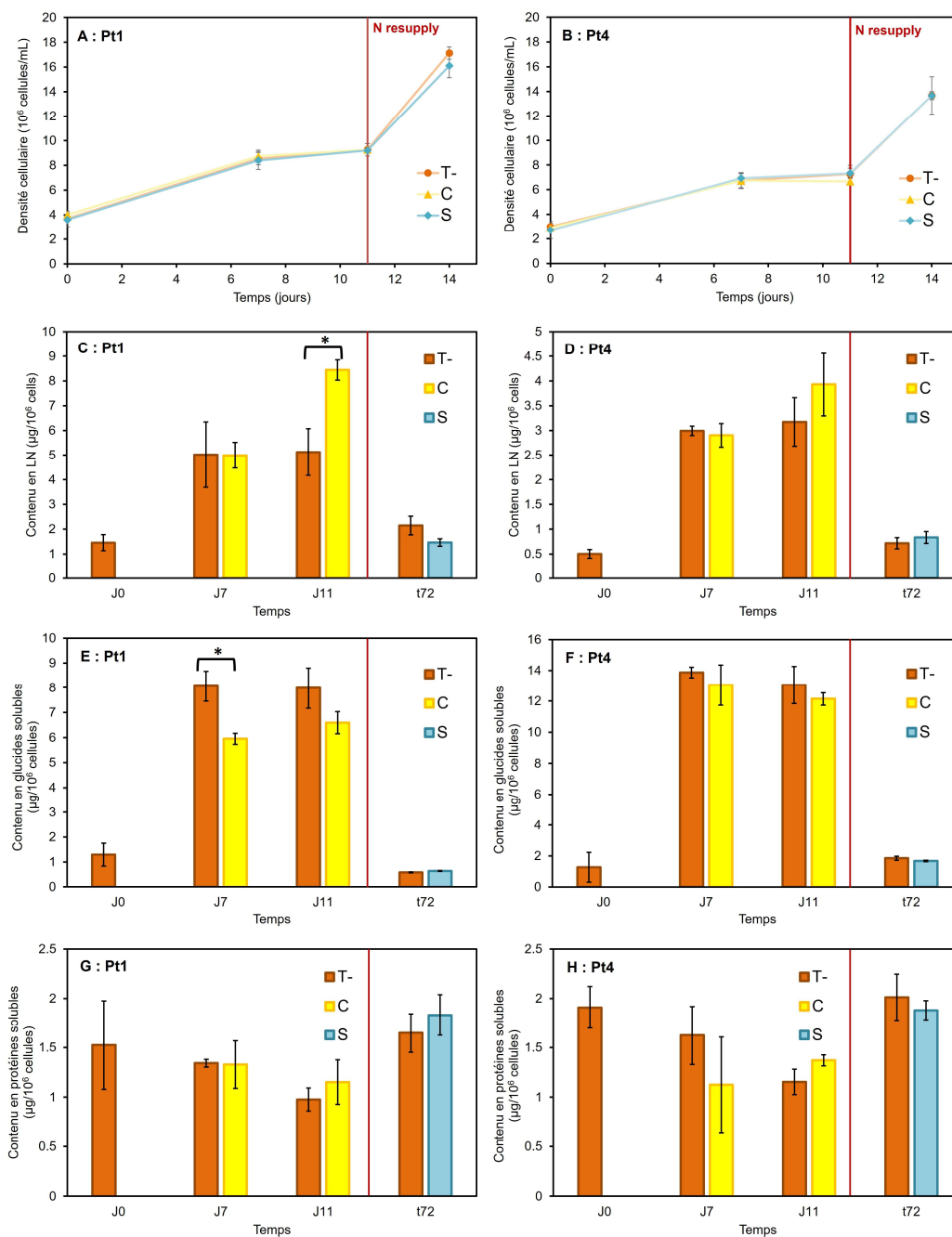


Figure 51 : Évolution de la densité cellulaire (A-B), des contenus en lipides neutres (C-D), glucides solubles (E-F) et protéines solubles (G-H) observée dans les cultures soumises à une carence en azote suivie d'une resupplémentation avec traitement par la chloroquine. T : Témoin traité avec de l'eau ultra pure, C : Traitement au moment de la mise en carence, S : Traitement au moment de la resupplémentation. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les conditions à un temps de prélèvement donné (t-test, p-value < 0.05).

4.3.2 – Effets de l'ATGlistatine

Les effets du traitement par l'ATGlistatine au cours de la carence et de la resupplémentation sont présentés dans la **Figure 52**.

Concernant la croissance, un effet similaire a été observé dans les deux écotypes avec une inhibition de l'augmentation de densité cellulaire au moment du traitement (**Figure 52A et B**). Cette inhibition semble indiquer que la concentration du traitement est possiblement trop élevée. Si l'on considère l'hypothèse alternative que l'inhibition de croissance n'est pas due à un effet toxique, elle pourrait être liée à un éventuel effet de l'ATGlistatine sur le métabolisme.

Les effets sur les paramètres biochimiques suivis sont présentés dans les **Figures 52C à H**. Les tendances globales observées chez les deux souches sont les mêmes. En carence, une diminution du taux de lipides neutres (significative chez Pt4 à J7) et une augmentation du taux de glucides solubles (significative chez Pt1 à J7 et J11) sont observées (**Figure 52C à F**). Cette diminution du taux de lipides neutres entre le témoin et le traitement pourrait indiquer que l'ATGlistatine inhibe le recyclage des lipides polaires, limitant ainsi l'accumulation des lipides neutres. En effet l'*Adipose Triglycérade Lipase*, cible de l'ATGlistatine, est une lipase *patatin-like*, famille d'enzymes qui peuvent avoir une fonction phospholipase. L'augmentation des glucides solubles en carence avec traitement observée pour Pt1 pourrait indiquer que les microalgues utilisent les glucides comme stockage alternatif de carbone (**Figure 52E**). Après resupplémentation, le traitement semble avoir diminué légèrement la consommation de lipides neutres, de manière significative chez Pt1 (**Figure 52C**). L'ATGlistatine a donc potentiellement également un effet d'inhibition de la lipolyse bien qu'il semble faible.

Enfin, il faut noter que dans l'ensemble des conditions, malgré une reprise de croissance du témoin (**Figure 52A et B**), le contenu en protéines solubles ne revient pas à la valeur initiale, ce qui n'est pas le cas pour les lipides neutres et les glucides solubles (**Figure 52C à H**). Une hypothèse pourrait être un effet toxique du DMSO, ce qui expliquerait également la variabilité plus importante observée en microplaque dans les expériences de traitement avec l'ATGlistatine (**Figure 50**).

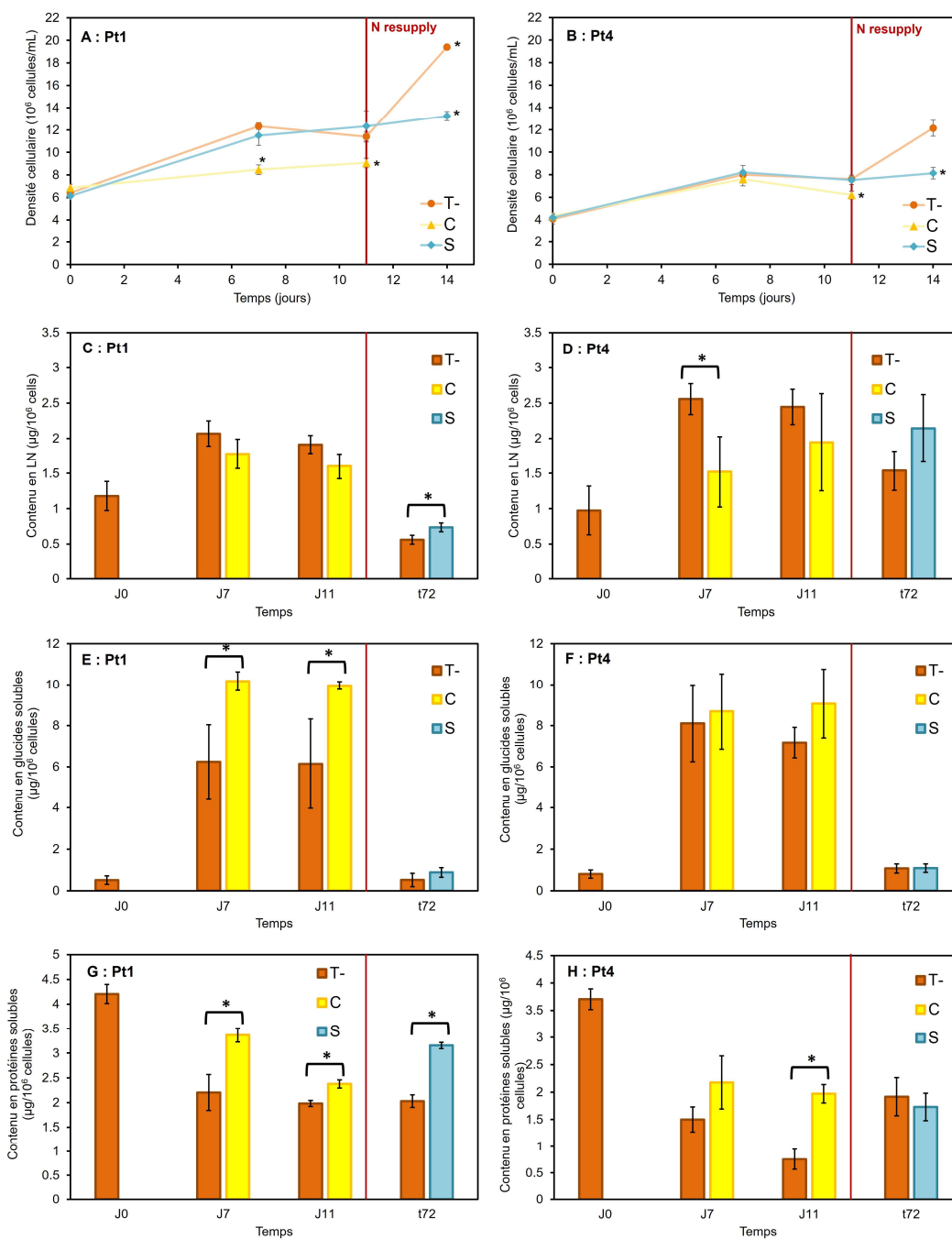


Figure 52 : Évolution de la densité cellulaire (A-B), des contenus en lipides neutres (C-D), glucides solubles (E-F) et protéines solubles (G-H) observée dans les cultures soumises à une carence en azote suivie d’une resupplémentation avec traitement par l’ATGlistatine. T : Témoin traité avec de l’eau ultra pure, C : Traitement au moment de la mise en carence, S : Traitement au moment de la resupplémentation. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les conditions à un temps de prélèvement donné (t-test, p-value < 0.05).

4.4 – Discussion et améliorations possibles

Les résultats présentés ici ne sont que préliminaires et relèvent d'une approche exploratoire à la fois du traitement de *P. tricornutum* par des inhibiteurs de la dégradation des lipides et de la répartition entre lipolyse et lipophagie. Ils suggèrent toutefois des effets du traitement, en particulier de l'ATGlistatine dans les deux phases de traitement, mais également de la chloroquine en carence. Cependant, les effets faibles voire non significatifs appellent à améliorer cette première expérience pour vérifier les résultats obtenus.

Plusieurs pistes d'amélioration peuvent être proposées. Tout d'abord, il faudrait tester l'effet du DMSO seul sur une culture, notamment sur l'évolution de la densité cellulaire. Le DMSO représentait environ 1% du volume total de culture dans les cultures en microplaques, tandis qu'il représentait au maximum 0,03% dans les cultures en erlenmeyer. C'est donc dans les premières que le DMSO pourrait avoir eu le plus d'effet toxique. Une expérience de traitement avec différentes doses de DMSO pourrait permettre d'évaluer cet effet. Il pourrait également être vérifié si le DMSO est nécessaire pour le traitement par l'ATGlistatine ou si l'eau pourrait être utilisée comme solvant pour ce traitement également.

Une autre piste pourrait être explorée au niveau du contrôle de la dose à administrer. En nous fondant sur les quelques expériences publiées (Franz et al., 2013; Conte et al., 2018; Nonoyama et al., 2019), nous avons traité les cultures à la concentration déterminée par les essais en microplaques 12 puits, sans rapporter la dose de traitement à la densité cellulaire au moment du traitement. Cet ajustement de la dose permettrait des conditions de traitement mieux contrôlées. Un autre facteur de contrôle pourrait être de vérifier l'état physiologique des cellules à l'inoculation puis tout au long de l'expérience, par exemple par des mesures de fluorescence de la chlorophylle.

Enfin, si les résultats préliminaires sont confirmés avec l'amélioration des conditions expérimentales, un traitement conjoint par les deux inhibiteurs pourrait être mené pour contrôler si l'activité de dégradation des lipides est complètement inhibée. D'autres inhibiteurs de lipases, tels que la tétrahydrolipstatine (Orlistat), ayant une activité DG lipase chez l'être humain (Franz et al., 2013), pourraient éventuellement être testés pour comparer leur effet avec celui de l'ATGlistatine.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans l'étude du métabolisme des lipides neutres chez le modèle *Phaeodactylum tricornutum*. Les expériences réalisées avaient pour but d'une part d'explorer les processus qui se déroulent après une resupplémentation en azote des microalgues carencées et d'autre part d'évaluer les effets sur les deux écotypes Pt1 et Pt4 en les comparant au cours du temps.

Les dynamiques biochimiques et cellulaires de Pt1 et Pt4 pendant une carence en azote

La réponse générale communément observée à une carence en azote chez les diatomées est un ralentissement du métabolisme vers une période de quiescence, le temps que des conditions environnementales plus favorables reviennent. Ce ralentissement s'accompagne d'une accumulation de composés de réserve, d'une réduction de l'appareil photosynthétique et d'un recyclage des molécules contenant de l'azote. Nous avons observé ces réponses chez les deux écotypes, avec dans un premier temps une augmentation rapide des glucides solubles, et donc potentiellement de la chrysolaminarine, suivie d'une augmentation plus lente et progressive des lipides neutres. Cette observation souligne le rôle des glucides dans la réponse à un stress de court terme tandis que les lipides répondent à un stress plus long, comme décrit chez d'autres microalgues. La quantification de l'expression des transcrits en carence n'a pas permis d'observer une régulation particulière des gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse des glucides, probablement car les prélèvements réalisés l'ont été après 11 jours de carence. De manière générale, la plupart des gènes de la synthèse des lipides était peu régulée, comme précédemment décrit dans la littérature. Cela est probablement lié à une régulation de la synthèse des lipides très en amont des voies métaboliques, par la production de précurseurs comme l'acétyl-CoA ou les équivalents réducteurs. Néanmoins une acide lysophosphatidique acyltransférase (Phatr3_J45551), enzyme de la voie de Kennedy, était particulièrement surrégulée pendant la carence (+4,3 fois chez Pt1, +5,1 fois chez Pt4) soulignant son implication probable dans la synthèse des lipides neutres.

Par ailleurs, l'accumulation de glucides et de lipides se produit sans augmentation du quota intracellulaire en carbone, une observation qui indique que la carence limite la fixation nette de CO₂ et induit plutôt un recyclage d'autres composés présents dans les cellules pour nourrir la synthèse de glucides et de lipides. Nous avons observé par microscopie que la carence en azote induisait une augmentation du volume moyen de LD par cellule, cohérent avec l'augmentation des lipides neutres, tandis que le volume du plaste diminuait dans le même temps. Cette évolution soutient un possible recyclage de composants du plaste pour la synthèse des lipides neutres stockés dans les LD. Ce recyclage pourrait d'ailleurs être accompli par plusieurs lipases putatives (chez Pt1 : Phatr3_41624, chez Pt4 :

Phatr3_EG02330 et Phatr3_EG02610), qui sont surrégulées pendant la carence, bien que ces enzymes doivent encore être étudiées par des approches fonctionnelles.

Malgré ces processus communs, les deux écotypes Pt1 et Pt4 de *P. tricornutum* ont également présenté des différences. Les cellules de Pt4 sont plus grandes que celles de Pt1. L'écotype Pt4 a également un plaste plus grand que Pt1 avant carence et accumule un volume total de LD par cellule plus important. Ces observations nous ont conduits, avec l'appui de données bibliographiques, à émettre l'hypothèse que l'un des facteurs limitants de l'accumulation des lipides serait le volume du plaste avant carence, en tant que source de composés à remobiliser. L'influence des conditions de lumière pour la culture semble déterminante pour la comparaison des écotypes. En effet, une analyse de la physiologie photosynthétique a montré que la souche Pt1 utilisée dans cette étude avait un optimum photosynthétique à une intensité lumineuse plus importante que la souche Pt4. Dans l'étude de biochimie, une intensité lumineuse optimale pour chaque écotype a été choisie (300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ pour Pt1 et 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ pour Pt4, telle que déterminée par les courbes photosynthèse-irradiance) et les différences en taux de pigments et en accumulation de lipides pendant la carence en azote étaient plus faibles, voire inexistantes. Outre les conditions d'illumination, l'état initial de l'inoculum apparaît à la fois comme un facteur déterminant dans l'accumulation de lipides et comme un facteur difficile à contrôler. Pour l'avenir, il apparaît nécessaire d'identifier des indicateurs décrivant l'état physiologique des cultures servant d'inoculum pour une meilleure répétabilité des résultats à travers les expériences.

Certaines différences entre les écotypes ont toutefois pu être identifiées, en accord avec les données bibliographiques. Au niveau biochimique, la différence la plus importante entre les souches dans cette expérience reste un taux de glucides solubles plus important pour Pt4 que pour Pt1 tout au long de la carence. Au niveau de la dynamique d'accumulation des LD, l'analyse de microscopie a précisé les caractéristiques des populations de LD chez Pt1 et Pt4, confirmant que Pt4 accumule la majorité de ses lipides dans 1 ou 2 grosses LD (90% du volume total des lipides dans les 2 plus grandes LD) tandis que Pt1 répartit les lipides plus équitablement entre les LD (55-75% des lipides dans les deux plus grandes LD). Les raisons de cette différence n'ont cependant pas encore été élucidées. Une piste pourrait se trouver dans les deux protéines majeures de LD. Une expérience de mise en relation entre le volume des LD et l'abondance de chacune des protéines majeures pourrait être conduite, par exemple en quantifiant le volume avec une approche de microscopie et en parallèle réaliser une extraction des protéines suivie d'une analyse de Western Blot pour quantifier chaque protéine.

Les effets de la resupplémentation en azote sur Pt1 et Pt4 et les mécanismes de dégradation des lipides.

De manière cohérente avec un état de quiescence induit par la carence en azote, la resupplémentation a induit le retour des microalgues dans un état actif, en plusieurs étapes.

La réponse initiale des deux écotypes a été une consommation rapide des glucides solubles, dès 12 heures après resupplémentation. Un gène d'exo- β -glucosidase (Phatr3_J43302), sous-régulé en carence est particulièrement sur-exprimé (+ 3,7 fois (24h) et + 7,8 fois (72h) chez Pt1, + 2 fois (24h) et + 3 fois (72h) chez Pt4) après resupplémentation, suggérant un rôle important dans cette consommation chez Pt1 et Pt4. Ensuite, les taux de protéines et de pigments augmentent, traduisant la remise en place de l'appareil photosynthétique comme également observé en microscopie par une augmentation du volume du plaste. Enfin, la consommation des lipides neutres a lieu, concomitamment avec une reprise des divisions cellulaires. Ces étapes suggèrent une utilisation différente des glucides et des lipides de réserve. Les premiers serviraient pour fournir l'énergie et les squelettes carbonés nécessaires à la remise en place d'un système photosynthétique et à la synthèse des protéines, avant que les seconds ne fournissent le complément d'énergie nécessaire à la division cellulaire.

La diminution observée des taux de lipides neutres fait suite à un phénomène de fragmentation des LD décrit par les observations en microscopie confocale. Les mécanismes à l'origine de cette fragmentation ne sont pas connus, mais pourraient être liés à une augmentation du rapport surface/volume des LD, facilitant leur accès pour des enzymes lipolytiques. Parmi les lipases putatives identifiées par notre approche utilisant les jeux de données bioinformatiques, deux d'entre elles pourraient avoir une implication dans la consommation des lipides, en particulier l' α/β hydrolase Phatr3_EG02408 fortement sur-exprimée (+ 6,5 fois chez Pt1, + 11,9 fois chez Pt4) après 24 heures de resupplémentation. La *patatin-like* Phatr3_EG00720 pourrait être spécifique de Pt4 car elle n'a été sur-exprimée dans ces conditions que chez cet écotype. Un éloignement des LD du plaste (et de la mitochondrie) a également été observé en microscopie. Une hypothèse pour ce phénomène pourrait être l'implication de la lipophagie, dégradation de LD par autophagie, qui se déroule dans les vacuoles. Il n'existe actuellement pas d'estimation de l'implication respective de ces deux mécanismes (lipolyse et lipophagie). Des expériences de microscopie électronique pourraient être mises en œuvre pour mettre en évidence, au cours du temps, les interactions entre les LD et les autres compartiments cellulaires. De plus, l'inactivation de l'une des deux voies de dégradation des lipides est une autre approche possible. Nous avons ainsi mis en place une expérience préliminaire consistant à traiter les microalgues par des inhibiteurs de la lipolyse et de la lipophagie, avec pour objectifs d'évaluer leurs effets. Les résultats obtenus montrent une influence globalement

faible des traitements sur la biochimie des microalgues. Ils suggèrent néanmoins un effet de l'ATGlistatine, inhibiteur de la lipolyse, dans l'inhibition de la dégradation des lipides neutres non retrouvé avec la chloroquine, inhibiteur de la lipophagie. Cette expérience préliminaire est appelée à être améliorée au niveau du protocole de traitement.

De manière générale, l'étude de la réponse à une resupplémentation en azote, induisant une dégradation des glucides solubles et des lipides, est riche en perspectives de recherche. Les approches utilisant les jeux de données bioinformatiques, comme celle mise en œuvre dans ce travail pour les lipases, permettent d'identifier des enzymes ayant un rôle potentiel dans les voies métaboliques. Cependant, ces cibles doivent être confirmées par des analyses fonctionnelles et éventuellement enzymatiques afin d'être validées.

Pour la dégradation des lipides en particulier, de nombreux aspects restent à déterminer. Quelles lipases sont impliquées dans la lipophagie ? Ceci pourrait être testé en exprimant des protéines de fusion eGFP-lipases et de suivre leur localisation. Quelle est la spécificité des lipases pour les différentes espèces de triglycérides (position et composition des chaînes acyl) ? Ceci pourrait être caractérisé par des suivis de la dégradation au niveau lipidomique, par exemple par des analyses de LC-MS/MS permettant de suivre l'ensemble des espèces lipidiques des classes. Quelle part des acides gras est consommée par β -oxydation, et quelle part est réincorporée dans d'autres lipides ? Ceci pourrait être testé par des expériences de suivi des isotopes du carbone entre les différentes classes.

La voie vers une compréhension globale des réponses à une resupplémentation en azote est encore longue. De grands efforts de recherche seront encore nécessaires avant d'en obtenir des applications pour la production de souches avec une productivité en lipides élevée. Le travail réalisé au cours de cette thèse en constitue les premières étapes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abida, H., Dolch, L.-J., Meř, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M. A., et al. (2015). Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* 167, 118–136. doi: 10.1104/pp.114.252395.
- Akoh, C. C., Lee, G.-C., Liaw, Y.-C., Huang, T.-H., and Shaw, J.-F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* 43, 534–552. doi: 10.1016/j.plipres.2004.09.002.
- Alipanah, L., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A. M., and Brembu, T. (2015). Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *EXBOTJ* 66, 6281–6296. doi: 10.1093/jxb/erv340.
- Alipanah, L., Winge, P., Rohloff, J., Najafi, J., Brembu, T., and Bones, A. M. (2018). Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *PLoS ONE* 13, e0193335. doi: 10.1371/journal.pone.0193335.
- Allen, A. E., Dupont, C. L., Oborník, M., Horák, A., Nunes-Nesi, A., McCrow, J. P., et al. (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature* 473, 203–207. doi: 10.1038/nature10074.
- Almagro Armenteros, J. J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Elofsson, A., et al. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci. Alliance* 2, e201900429. doi: 10.26508/lsa.201900429.
- Apt, K. E., Grossman, A. R., and Kroth-Pancic, P. G. (1996). Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Molec. Gen. Genet.* 252, 572–579. doi: 10.1007/BF02172403.
- Arao, T., Sakaki, T., and Yamada, M. (1994). Biosynthesis of polyunsaturated lipids in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytochemistry* 36, 629–635. doi: 10.1016/S0031-9422(00)89787-3.
- Arao, T., and Yamada, M. (1994). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytochemistry* 35, 1177–1181. doi: 10.1016/S0031-9422(00)94817-9.
- Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W., Schindelin, J., Cardona, A., et al. (2017). Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics* 33, 2424–2426. doi: 10.1093/bioinformatics/btx180.

Armbrust, E. V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* 459, 185–192. doi: 10.1038/nature08057.

Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., et al. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306, 79–86. doi: 10.1126/science.1101156.

B

Bailleul, B., Berne, N., Murik, O., Petroutsos, D., Prihoda, J., Tanaka, A., et al. (2015). Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Nature* 524, 366–369. doi: 10.1038/nature14599.

Balamurugan, S., Wang, X., Wang, H.-L., An, C.-J., Li, H., Li, D.-W., et al. (2017). Occurrence of plastidial triacylglycerol synthesis and the potential regulatory role of AGPAT in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* 10, 97. doi: 10.1186/s13068-017-0786-0.

Balduyck, L., Stock, T., Bijttebier, S., Bruneel, C., Jacobs, G., Voorspoels, S., et al. (2017). Integrity of the microalgal cell plays a major role in the lipolytic stability during wet storage. *Algal Res.* 25, 516–524. doi: 10.1016/j.algal.2017.06.013.

Barka, F., Angstenberger, M., Ahrendt, T., Lorenzen, W., Bode, H. B., and Büchel, C. (2016). Identification of a triacylglycerol lipase in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol.* 1861, 239–248. doi: 10.1016/j.bbailip.2015.12.023.

Basu, S., Patil, S., Mapleson, D., Russo, M. T., Vitale, L., Fevola, C., et al. (2017). Finding a partner in the ocean: molecular and evolutionary bases of the response to sexual cues in a planktonic diatom. *New Phytol.* 215, 140–156. doi: 10.1111/nph.14557.

Benoiston, A.-S., Ibarbalz, F. M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S., et al. (2017). The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160397. doi: 10.1098/rstb.2016.0397.

Bergé, J.-P., Gouygou, J.-P., Dubacq, J.-P., and Durand, P. (1995). Reassessment of lipid composition of the diatom *Skeletonema costatum*. *Phytochemistry* 39, 1017–1021. doi: 10.1016/0031-9422(94)00156-N.

Bertrand, J., Coste, C., Le Cohu, R., Renon, J.-P., and Ector, L. (2016). Étude préliminaire sur la présence de diatomées sur les lichens. *Bot. Lett.* 163, 93–115. doi: 10.1080/23818107.2016.1156573.

- Bielen, A., Četković, H., Long, P. F., Schwab, H., Abramić, M., and Vujaklija, D. (2009). The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (aryl)esterase and a true lipase activity. *Biochimie* 91, 390–400. doi: 10.1016/j.biochi.2008.10.018.
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Borowitzka, M. (2018). “Commercial-Scale Production of Microalgae for Bioproducts,” in *Blue Biotechnology. Production and Use of Marine Molecules*, eds. S. La Barre and S. S. Bates, 33–65. doi: 10.1002/9783527801718.ch2.
- Borowitzka, M. A. (2013). “Energy from Microalgae: A Short History,” in *Algae for Biofuels and Energy*, eds. M. A. Borowitzka and N. R. Moheimani (Dordrecht: Springer Netherlands), 1–15. doi: 10.1007/978-94-007-5479-9_1.
- Bower, I. D. (2019). Investigating mechanisms of triacylglycerol synthesis induced by nitrogen depletion in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* and characterising its diacylglycerol acyltransferases and phospholipid:diacylglycerol acyltransferase. *PhD Thesis. University of Cambridge*.
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., et al. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239–244. doi: 10.1038/nature07410.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Branco-Vieira, M., Mata, T. M., Martins, A. A., Freitas, M. A. V., and Caetano, N. S. (2020). Economic analysis of microalgae biodiesel production in a small-scale facility. *Energy Rep.* 6, 325–332. doi: 10.1016/j.egy.2020.11.156.
- Brodrick, J. T., Du, N., Smith, S. R., Tsuji, Y., Jallet, D., Ware, M. A., et al. (2019). Cross-compartment metabolic coupling enables flexible photoprotective mechanisms in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol.* 222, 1364–1379. doi: 10.1111/nph.15685.
- Budge, S. M., and Parrish, C. C. (1999). Lipid class and fatty acid composition of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *Pseudo-nitzschia pungens* and effects of lipolytic enzyme deactivation. *Phytochemistry* 52, 561–566. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00241-1).
- Burch, A. R., and Franz, A. K. (2016). Combined nitrogen limitation and hydrogen peroxide treatment enhances neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresour. Technol.* 219, 559–565. doi: 10.1016/j.biortech.2016.08.010.

Burki, F. (2017). “The Convolved Evolution of Eukaryotes With Complex Plastids,” in *Advances in Botanical Research* (Elsevier), 1–30. doi: 10.1016/bs.abr.2017.06.001.

Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., and Simpson, A. G. B. (2020). The new tree of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* 35, 43–55. doi: 10.1016/j.tree.2019.08.008.

Burrows, E. H., Bennette, N. B., Carrieri, D., Dixon, J. L., Brinker, A., Frada, M., et al. (2012). Dynamics of lipid biosynthesis and redistribution in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrate deprivation. *Bioenerg. Res.* 5, 876–885. doi: 10.1007/s12155-012-9201-7.

Butler, T., Kapoore, R. V., and Vaidyanathan, S. (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: a diatom cell factory. *Trends Biotechnol.* 38, 606–622. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.12.023.

C

Calleja, P., Leterrier, M., and Maréchal, E. (2015). Modified algae strain and method of triacylglycerol accumulation using said strain. patent n°WO2015008160A2.

Carreto, J. I., and Catoggio, J. A. (1977). An indirect method for the rapid estimation of carotenoid contents in *Phaeodactylum tricornutum*: possible application to other marine algae. *Mar. Biol.* 40, 109–116.

Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., and Sandoval, G. (2018). “Lipases: an overview,” in *Lipases and Phospholipases Methods in Molecular Biology.*, ed. G. Sandoval (New York, NY: Springer New York), 3–38. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_1.

Chaumier, T., Yang, F., Manirakiza, E., Ait-Mohamed, O., Wu, Y., Chandola, U., et al. (2023). Genome wide assessment of genetic diversity and transcript variations in 17 accessions of the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *preprint*. doi: 10.1101/2023.05.31.543125.

Chauton, M. S., Winge, P., Brembu, T., Vadstein, O., and Bones, A. M. (2013). Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles. *Plant Physiol.* 161, 1034–1048. doi: 10.1104/pp.112.206177.

Chen, J., Yang, J., Du, H., Aslam, M., Wang, W., Chen, W., et al. (2021). Laminarin, a major polysaccharide in Stramenopiles. *Mar. Drugs* 19, 576. doi: 10.3390/md19100576.

Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., et al. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour. Technol.* 229, 53–62. doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.006.

- Chu, J., Li, Y., Cui, Y., and Qin, S. (2019). The influences of phytohormones on triacylglycerol accumulation in an oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Phycol.* 31, 1009–1019. doi: 10.1007/s10811-018-1623-y.
- Claros, M. G., and Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241, 779–786. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00779.x.
- Conte, M., Lupette, J., Seddiki, K., Meï, C., Dolch, L.-J., Gros, V., et al. (2018). Screening for biologically annotated drugs that trigger triacylglycerol accumulation in the diatom *Phaeodactylum*. *Plant Physiol.* 177, 532–552. doi: 10.1104/pp.17.01804.
- Cruz De Carvalho, M. H., Sun, H., Bowler, C., and Chua, N. (2016). Noncoding and coding transcriptome responses of a marine diatom to phosphate fluctuations. *New Phytol.* 210, 497–510. doi: 10.1111/nph.13787.
- Cui, Y., Zhao, J., Wang, Y., Qin, S., and Lu, Y. (2018). Characterization and engineering of a dual-function diacylglycerol acyltransferase in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* 11, 32. doi: 10.1186/s13068-018-1029-8.
- Cui, Y., Zheng, G., Li, X., Lin, H., Jiang, P., and Qin, S. (2013). Cloning and characterization of a novel diacylglycerol acyltransferase from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Phycol.* 25, 1509–1512. doi: 10.1007/s10811-013-9991-9.

D

- Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A., Dubois, G., Guyot, V., Perez-Michaut, C., et al. (2014). Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nat. Commun.* 5, 3831. doi: 10.1038/ncomms4831.
- D'Andrea, S. (2016). Lipid droplet mobilization: The different ways to loosen the purse strings. *Biochimie* 120, 17–27. doi: 10.1016/j.biochi.2015.07.010.
- de Martino, A., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., and Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *J. Phycol.* 43, 992–1009. doi: 10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x.
- Dinamarca, J., Levitan, O., Kumaraswamy, G. K., Lun, D. S., and Falkowski, P. G. (2017). Overexpression of a diacylglycerol acyltransferase gene in *Phaeodactylum tricornutum* directs carbon towards lipid biosynthesis. *J. Phycol.* 53, 405–414. doi: 10.1111/jpy.12513.

Dolch, L.-J., Lupette, J., Tourcier, G., Bedhomme, M., Collin, S., Magneschi, L., et al. (2017a). Nitric oxide mediates nitrite-sensing and acclimation and triggers a remodeling of lipids. *Plant Physiol.* 175, 1407–1423. doi: 10.1104/pp.17.01042.

Dolch, L.-J., and Maréchal, E. (2015). Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs* 13, 5732–5735. doi: 10.3390/md13095732.

Dolch, L.-J., Rak, C., Perin, G., Tourcier, G., Broughton, R., Leterrier, M., et al. (2017b). A palmitic acid elongase affects eicosapentaenoic acid and plastidial monogalactosyldiacylglycerol levels in *Nannochloropsis*. *Plant Physiol.* 173, 742–759. doi: 10.1104/pp.16.01420.

Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P. G., et al. (2003). New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal $\Delta 12$ -fatty acid desaturases. *Plant Physiol.* 131, 1648–1660. doi: 10.1104/pp.102.018317.

Duarte, B., Feijão, E., Goessling, J. W., Caçador, I., and Matos, A. R. (2021). Pigment and fatty acid production under different light qualities in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Sci.* 11, 2550. doi: 10.3390/app11062550.

Dubois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, Fred. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi: 10.1021/ac60111a017.

Dyrløv Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783–795. doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.028.

F

Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., and Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta - Mol.* 1811, 637–647. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.06.009.

Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., et al. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305, 354–360. doi: 10.1126/science.1095964.

Feng, T.-Y., Yang, Z.-K., Zheng, J.-W., Xie, Y., Li, D.-W., Murugan, S. B., et al. (2015). Examination of metabolic responses to phosphorus limitation via proteomic analyses in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Sci. Rep.* 5, 10373. doi: 10.1038/srep10373.

Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., and Falkowski, P. G. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281, 237–240. doi: 10.1126/science.281.5374.237.

Fierli, D., Barone, M. E., Donnell, A. M., Conlon, T., and Touzet, N. (2023). Combined application of exogenous phytohormones and blue light illumination to the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 71, 103052. doi: 10.1016/j.algal.2023.103052.

Flori, S., Jouneau, P.-H., Bailleul, B., Gallet, B., Estrozi, L. F., Moriscot, C., et al. (2017). Plastid thylakoid architecture optimizes photosynthesis in diatoms. *Nat. Commun.* 8, 15885. doi: 10.1038/ncomms15885.

Flori, S., Jouneau, P.-H., Finazzi, G., Maréchal, E., and Falconet, D. (2016). Ultrastructure of the periplastidial compartment of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist* 167, 254–267. doi: 10.1016/j.protis.2016.04.001.

Foets, J., Wetzel, C. E., Teuling, A. J., and Pfister, L. (2020). Temporal and spatial variability of terrestrial diatoms at the catchment scale: controls on productivity and comparison with other soil algae. *PeerJ* 8, e9198. doi: 10.7717/peerj.9198.

Frada, M. J., Burrows, E. H., Wyman, K. D., and Falkowski, P. G. (2013). Quantum requirements for growth and fatty acid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) in nitrogen replete and limited conditions. *J. Phycol.* 49, 381–388. doi: 10.1111/jpy.12046.

Franz, A. K., Danielewicz, M. A., Wong, D. M., Anderson, L. A., and Boothe, J. R. (2013). Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity. *ACS Chem. Biol.* 8, 1053–1062. doi: 10.1021/cb300573r.

G

Galas, L., Burel, C., Schapman, D., Ropitiaux, M., Bernard, S., Bénard, M., et al. (2021). Comparative structural and functional analyses of the fusiform, oval, and triradiate morphotypes of *Phaeodactylum tricornutum* Pt3 strain. *Front. Plant Sci.* 12, 638181. doi: 10.3389/fpls.2021.638181.

Ge, F., Huang, W., Chen, Z., Zhang, C., Xiong, Q., Bowler, C., et al. (2014). Methylcrotonyl-CoA carboxylase regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Cell* 26, 1681–1697. doi: 10.1105/tpc.114.124982.

Gololobova, M. A., and Belyakova, G. A. (2022). Position of algae on the tree of life. *Dokl. Biol. Sci.* 507, 312–326. doi: 10.1134/S0012496622060035.

- Gong, Y., Guo, X., Wan, X., Liang, Z., and Jiang, M. (2011). Characterization of a novel thioesterase (PtTE) from *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Basic Microbiol.* 51, 666–672. doi: 10.1002/jobm.201000520.
- Gong, Y., Zhang, J., Guo, X., Wan, X., Liang, Z., Hu, C. J., et al. (2013). Identification and characterization of PtDGAT2B, an acyltransferase of the DGAT2 acyl-Coenzyme A: Diacylglycerol acyltransferase family in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *FEBS Lett.* 587, 481–487. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.015.
- Goold, H., Beisson, F., Peltier, G., and Li-Beisson, Y. (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Rep.* 34, 545–555. doi: 10.1007/s00299-014-1711-7.
- Grosche, C., Hempel, F., Bolte, K., Zauner, S., and Maier, U. G. (2014). The periplastidal compartment: a naturally minimized eukaryotic cytoplasm. *Curr. Opin. Microbiol.* 22, 88–93. doi: 10.1016/j.mib.2014.09.017.
- Gruber, A., Rocap, G., Kroth, P. G., Armbrust, E. V., and Mock, T. (2015). Plastid proteome prediction for diatoms and other algae with secondary plastids of the red lineage. *Plant J.* 81, 519–528. doi: 10.1111/tpj.12734.
- Gschloessl, B., Guermeur, Y., and Cock, J. M. (2008). HECTAR: A method to predict subcellular targeting in heterokonts. *BMC Bioinform.* 9, 393. doi: 10.1186/1471-2105-9-393.
- Guéguen, N., Le Moigne, D., Amato, A., Salvaing, J., and Maréchal, E. (2021). Lipid droplets in unicellular photosynthetic stramenopiles. *Front. Plant Sci.* 12, 639276. doi: 10.3389/fpls.2021.639276.
- Guerra, L. T., Levitan, O., Frada, M. J., Sun, J. S., Falkowski, P. G., and Dismukes, G. C. (2013). Regulatory branch points affecting protein and lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biomass Bioenergy* 59, 306–315. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.10.007.
- Guidi, L., Chaffron, S., Bittner, L., Eveillard, D., Larhlimi, A., Roux, S., et al. (2016). Plankton networks driving carbon export in the oligotrophic ocean. *Nature* 532, 465–470. doi: 10.1038/nature16942.
- Guihéneuf, F., Leu, S., Zarka, A., Khozin-Goldberg, I., Khalilov, I., and Boussiba, S. (2011). Cloning and molecular characterization of a novel acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1-like gene (PtDGAT1) from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: *P. tricornutum* DGAT1 cloning and characterization. *FEBS J.* 278, 3651–3666. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08284.x.

Guihéneuf, F., Mimouni, V., Tremblin, G., and Ulmann, L. (2015). Light intensity regulates LC-PUFA incorporation into lipids of *Pavlova lutheri* and the final desaturase and elongase activities involved in their biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1261–1267. doi: 10.1021/jf504863u.

Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L., and Tremblin, G. (2009). Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 369, 136–143. doi: 10.1016/j.jembe.2008.11.009.

Guillard, R. R. L., and Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239. doi: 10.1139/m62-029.

Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *J. Phycol.* 48, 1057–1063. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x.

Guo, X., Jiang, M., Wan, X., Hu, C., and Gong, Y. (2014). Identification and biochemical characterization of five long-chain acyl-coenzyme A synthetases from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol. Biochem.* 74, 33–41. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.10.036.

H

Haimovich-Dayan, M., Garfinkel, N., Ewe, D., Marcus, Y., Gruber, A., Wagner, H., et al. (2013). The role of C₄ metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol.* 197, 177–185. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04375.x.

Hallgren, J., Tsirigos, K. D., Pedersen, M. D., Almagro Armenteros, J. J., Marcatili, P., Nielsen, H., et al. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *preprint*. doi: 10.1101/2022.04.08.487609.

Hao, X., Chen, W., Amato, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Moog, D., et al. (2022). Multiplexed CRISPR/Cas9 editing of the long-chain acyl-CoA synthetase family in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* reveals that mitochondrial ptACSL3 is involved in the synthesis of storage lipids. *New Phytol.* 233, 1797–1812. doi: 10.1111/nph.17911.

Hao, X., Luo, L., Jouhet, J., Rébeillé, F., Maréchal, E., Hu, H., et al. (2018). Enhanced triacylglycerol production in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by inactivation of a Hotdog-fold thioesterase gene using TALEN-based targeted mutagenesis. *Biotechnol. Biofuels* 11, 312. doi: 10.1186/s13068-018-1309-3.

- Hartmann, M.-A. (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* 3, 170–175. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01233-3.
- Haslam, R. P., Hamilton, M. L., Economou, C. K., Smith, R., Hassall, K. L., Napier, J. A., et al. (2020). Overexpression of an endogenous type 2 diacylglycerol acyltransferase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* enhances lipid production and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content. *Biotechnol. Biofuels* 13, 87. doi: 10.1186/s13068-020-01726-8.
- He, L., Han, X., and Yu, Z. (2014). A rare *Phaeodactylum tricornutum* cruciform morphotype: culture conditions, transformation and unique fatty acid characteristics. *PLoS ONE* 9, e93922. doi: 10.1371/journal.pone.0093922.
- Heydarizadeh, P., Veidl, B., Huang, B., Lukomska, E., Wielgosz-Collin, G., Couzinet-Mossion, A., et al. (2019). Carbon orientation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: the effects of carbon limitation and photon flux density. *Front. Plant Sci.* 10, 471. doi: 10.3389/fpls.2019.00471.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., and Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35, 403–424. doi: 10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x.
- Hopkinson, B. M., Dupont, C. L., and Matsuda, Y. (2016). The physiology and genetics of CO₂ concentrating mechanisms in model diatoms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 31, 51–57. doi: 10.1016/j.pbi.2016.03.013.
- Huang, B. (2018). Réponses physiologiques et biochimiques à une limitation nutritive en phosphore ou en azote sur la réorientation métabolique des lipides polaires chez différentes espèces de microalgues marines. *Thèse de doctorat. Le Mans Université.*
- Huang, B., Marchand, J., Blanckaert, V., Lukomska, E., Ulmann, L., Wielgosz-Collin, G., et al. (2019). Nitrogen and phosphorus limitations induce carbon partitioning and membrane lipid remodelling in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Eur. J. Phycol.* 54, 342–358. doi: 10.1080/09670262.2019.1567823.
- Huang, T., Hu, F., Pan, Y., Li, C., and Hu, H. (2023a). Pyruvate orthophosphate dikinase is required for the acclimation to high bicarbonate concentrations in *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 72, 103131. doi: 10.1016/j.algal.2023.103131.
- Huang, T., Pan, Y., Maréchal, E., and Hu, H. (2023b). Proteomes reveal the lipid metabolic network in the complex plastid of *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant J.*, tpj.16477. doi: 10.1111/tpj.16477.

Huesgen, P. F., Alami, M., Lange, P. F., Foster, L. J., Schröder, W. P., Overall, C. M., et al. (2013). Proteomic amino-termini profiling reveals targeting information for protein import into complex plastids. *PLoS ONE* 8, e74483. doi: 10.1371/journal.pone.0074483.

Hunter, J. E., Brandsma, J., Dymond, M. K., Koster, G., Moore, C. M., Postle, A. D., et al. (2018). Lipidomics of *Thalassiosira pseudonana* under phosphorus stress reveal underlying phospholipid substitution dynamics and novel diglycosylceramide substitutes. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02034-17. doi: 10.1128/AEM.02034-17.

J

Jallet, D., Xing, D., Hughes, A., Moosburner, M., Simmons, M. P., Allen, A. E., et al. (2020). Mitochondrial fatty acid β -oxidation is required for storage-lipid catabolism in a marine diatom. *New Phytol.* 228, 946–958. doi: 10.1111/nph.16744.

Jang, S., Kong, F., Lee, J., Choi, B. Y., Wang, P., Gao, P., et al. (2020). CrABCA2 facilitates triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen starvation. *Mol. Cells* 43, 48–57. doi: <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0262>.

Jaussaud, A., Lupette, J., Salvaing, J., Jouhet, J., Bastien, O., Gromova, M., et al. (2020). Stepwise biogenesis of subpopulations of lipid droplets in nitrogen starved *Phaeodactylum tricornutum* cells. *Front. Plant Sci.* 11, 48. doi: 10.3389/fpls.2020.00048.

Jeffrey, S. W., and Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167, 191–194. doi: 10.1016/S0015-3796(17)30778-3.

Jensen, E. L., Yangüez, K., Carrière, F., and Gontero, B. (2019). Storage compound accumulation in diatoms as response to elevated CO₂ concentration. *Biology* 9, 5. doi: 10.3390/biology9010005.

Johansson, O. N., Töpel, M., Pinder, M. I. M., Kourtchenko, O., Blomberg, A., Godhe, A., et al. (2019). *Skeletonema marinoi* as a new genetic model for marine chain-forming diatoms. *Sci. Rep.* 9, 5391. doi: 10.1038/s41598-019-41085-5.

Joun, J., Sirohi, R., Yu, B. S., Yang, H. E., and Sim, S. J. (2023). Utilizing wastewater and flue gas for enhancing biomass and high-value products from microalgae. *Phytochem. Rev.* 22, 861–877. doi: 10.1007/s11101-023-09876-x.

K

- Kaha, M., Noda, M., Maeda, Y., Kaneko, Y., Yoshino, T., and Tanaka, T. (2023). Characterization of oil body-associated proteins obtained from oil bodies with different sizes in oleaginous diatom *Fistulifera solaris*. *J. Biosci. Bioeng.* 135, 359–368. doi: 10.1016/j.jbiosc.2023.01.006.
- Karas, B. J., Diner, R. E., Lefebvre, S. C., McQuaid, J., Phillips, A. P. R., Noddings, C. M., et al. (2015). Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. *Nat. Commun.* 6, 6925. doi: 10.1038/ncomms7925.
- Kaur, S., Héroult, J., Caruso, A., Pencreac'h, G., Come, M., Gauvry, L., et al. (2021). Proteomics and expression studies on lipids and fatty acids metabolic genes in *Isochrysis galbana* under the combined influence of nitrogen starvation and sodium acetate supplementation. *Bioresour. Technol. Rep.* 15, 100714. doi: 10.1016/j.biteb.2021.100714.
- Kennedy, E. P. (1956). The biological synthesis of phospholipids. *Biochem. Cell Biol.* 34, 334–348. doi: <https://doi.org/10.1139/o56-036>.
- Kim, J., Brown, C. M., Kim, M. K., Burrows, E. H., Bach, S., Lun, D. S., et al. (2017). Effect of cell cycle arrest on intermediate metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114. doi: 10.1073/pnas.1711642114.
- Kim, J. Y., Jung, J.-M., Jung, S., Park, Y.-K., Tsang, Y. F., Lin, K.-Y. A., et al. (2022). Biodiesel from microalgae: recent progress and key challenges. *Prog. Energy Combust. Sci.* 93, 101020. doi: 10.1016/j.pecs.2022.101020.
- Kinoshita, H., Nagasaki, J., Yoshikawa, N., Yamamoto, A., Takito, S., Kawasaki, M., et al. (2011). The chloroplastic 2-oxoglutarate/malate transporter has dual function as the malate valve and in carbon/nitrogen metabolism: OMT in malate valve and C/N interaction. *Plant J.* 65, 15–26. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04397.x.
- Kong, F., Romero, I. T., Warakanont, J., and Li-Beisson, Y. (2018). Lipid catabolism in microalgae. *New Phytol.* 218, 1340–1348. doi: 10.1111/nph.15047.
- Kory, N., Farese, R. V., and Walther, T. C. (2016). Targeting fat: mechanisms of protein localization to lipid droplets. *Trends Cell Biol.* 26, 535–546. doi: 10.1016/j.tcb.2016.02.007.
- Kühn, S. F., and Brownlee, C. (2005). Membrane organisation and dynamics in the marine diatom *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae). *Bot. Mar.* 48. doi: 10.1515/BOT.2005.039.

L

- Lau, J. B., Stork, S., Moog, D., Sommer, M. S., and Maier, U. G. (2015). N-terminal lysines are essential for protein translocation via a modified ERAD system in complex plastids: protein import into complex plastids. *Mol. Microbiol.* 96, 609–620. doi: 10.1111/mmi.12959.
- Lee, R. E. (2008). *Phycology*. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press doi: 10.1017/CBO9780511812897.
- Levering, J., Broddrick, J., Dupont, C. L., Peers, G., Beerli, K., Mayers, J., et al. (2016). Genome-scale model reveals metabolic basis of biomass partitioning in a model diatom. *PLoS ONE* 11, e0155038. doi: 10.1371/journal.pone.0155038.
- Levitan, O., Dinamarca, J., Zelzion, E., Gorbunov, M. Y., and Falkowski, P. G. (2015a). An RNA interference knock-down of nitrate reductase enhances lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant J.* 84, 963–973. doi: 10.1111/tpj.13052.
- Levitan, O., Dinamarca, J., Zelzion, E., Lun, D. S., Guerra, L. T., Kim, M. K., et al. (2015b). Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 412–417. doi: 10.1073/pnas.1419818112.
- Lewin, J. C., Lewin, R. A., and Philpott, D. E. (1958). Observations on *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Gen. Microbiol.* 18, 418–426. doi: 10.1099/00221287-18-2-418.
- Leyland, B., Boussiba, S., and Khozin-Goldberg, I. (2020a). A review of diatom lipid droplets. *Biology* 9, 38. doi: 10.3390/biology9020038.
- Leyland, B., Zarka, A., Didi-Cohen, S., Boussiba, S., and Khozin-Goldberg, I. (2020b). High resolution proteome of lipid droplets isolated from the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* (*Bacillariophyceae*) strain pt4 provides mechanistic insights into complex intracellular coordination during nitrogen deprivation. *J. Phycol.* 56, 1642–1663. doi: 10.1111/jpy.13063.
- Li, C., Luo, X., Zhao, S., Siu, G. K., Liang, Y., Chan, H. C., et al. (2017). COPI – TRAPP II activates Rab18 and regulates its lipid droplet association. *EMBO J.* 36, 441–457. doi: 10.15252/emj.201694866.
- Li, N., Gügel, I. L., Giavalisco, P., Zeisler, V., Schreiber, L., Soll, J., et al. (2015). FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export. *PLoS Biol.* 13, e1002053. doi: 10.1371/journal.pbio.1002053.

- Li, N., Zhang, Y., Meng, H., Li, S., Wang, S., Xiao, Z., et al. (2019). Characterization of Fatty Acid Exporters involved in fatty acid transport for oil accumulation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Biofuels* 12, 14. doi: 10.1186/s13068-018-1332-4.
- Li, S., Chen, Y., Wang, Y., Yang, X., Wang, J., and Chen, H. (2020). Over-expression of LPAAT gene in *Phaeodactylum tricornutum* enhances fatty acid accumulation and increases fatty acid chain length. *Indian J. Pharm. Sci.* 82. doi: 10.36468/pharmaceutical-sciences.spl.76.
- Li, X., Benning, C., and Kuo, M.-H. (2012). Rapid triacylglycerol turnover in *Chlamydomonas reinhardtii* requires a lipase with broad substrate specificity. *Eukaryot. Cell* 11, 1451–1462. doi: 10.1128/EC.00268-12.
- Li, X., Pan, Y., and Hu, H. (2018). Identification of the triacylglycerol lipase in the chloroplast envelope of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 33, 440–447. doi: 10.1016/j.algal.2018.06.023.
- Liang, Y., Kong, F., Torres-Romero, I., Burlacot, A., Cuine, S., Légeret, B., et al. (2019). Branched-Chain amino acid catabolism impacts triacylglycerol homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 179, 1502–1514. doi: 10.1104/pp.18.01584.
- Liang, Y., Osada, K., Sunaga, Y., Yoshino, T., Bowler, C., and Tanaka, T. (2015). Dynamic oil body generation in the marine oleaginous diatom *Fistulifera solaris* in response to nutrient limitation as revealed by morphological and lipidomic analysis. *Algal Res.* 12, 359–367. doi: 10.1016/j.algal.2015.09.017.
- Li-Beisson, Y., Thelen, J. J., Fedosejevs, E., and Harwood, J. L. (2019). The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 74, 31–68. doi: 10.1016/j.plipres.2019.01.003.
- Liu, B., Sun, Y., Hang, W., Wang, X., Xue, J., Ma, R., et al. (2020). Characterization of a novel Acyl-ACP $\Delta 9$ Desaturase gene responsible for palmitoleic acid accumulation in a diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Front. Microbiol.* 11, 584589. doi: 10.3389/fmicb.2020.584589.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lommer, M., Specht, M., Roy, A.-S., Kraemer, L., Andreson, R., Gutowska, M. A., et al. (2012). Genome and low-iron response of an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *Genome Biol.* 13, R66. doi: 10.1186/gb-2012-13-7-r66.
- Longworth, J., Wu, D., Huete-Ortega, M., Wright, P. C., and Vaidyanathan, S. (2016). Proteome response of *Phaeodactylum tricornutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion. *Algal Res.* 18, 213–224. doi: 10.1016/j.algal.2016.06.015.

Lu, Y., Wang, X., Balamurugan, S., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Dong, H.-P., et al. (2017). Identification of a putative seipin ortholog involved in lipid accumulation in marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Phycol.* 29, 2821–2829. doi: 10.1007/s10811-017-1173-8.

Lupette, J., Jaussaud, A., Seddiki, K., Morabito, C., Brugière, S., Schaller, H., et al. (2019). The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 38, 101415. doi: 10.1016/j.algal.2019.101415.

M

Ma, Y.-H., Wang, X., Niu, Y.-F., Yang, Z.-K., Zhang, M.-H., Wang, Z.-M., et al. (2014). Antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase promotes the neutral lipid accumulation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Microb. Cell. Fact.* 13, 100. doi: 10.1186/s12934-014-0100-9.

Maeda, Y., Nojima, D., Yoshino, T., and Tanaka, T. (2017). Structure and properties of oil bodies in diatoms. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160408. doi: 10.1098/rstb.2016.0408.

Maeda, Y., Sunaga, Y., Yoshino, T., and Tanaka, T. (2014). Oleosome-associated protein of the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* contains an endoplasmic reticulum-targeting signal sequence. *Mar. Drugs* 12, 3892–3903. doi: 10.3390/md12073892.

Maeda, Y., Watanabe, K., Kaha, M., Yabu, Y., Yoshino, T., Matsumoto, M., et al. (2021). Assessment on the oil accumulation by knockdown of triacylglycerol lipase in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris*. *Sci. Rep.* 11, 20905. doi: 10.1038/s41598-021-00453-w.

Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., et al. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E1516–E1525. doi: 10.1073/pnas.1509523113.

Manandhar-Shrestha, K., and Hildebrand, M. (2015). Characterization and manipulation of a DGAT2 from the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Improved TAG accumulation without detriment to growth, and implications for chloroplast TAG accumulation. *Algal Res.* 12, 239–248. doi: 10.1016/j.algal.2015.09.004.

Mann, D. G., and Vanormelingen, P. (2013). An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60, 414–420. doi: 10.1111/jeu.12047.

Maréchal, E. (2021). Carburants à base d'algues oléagineuses Principes, filières, verrous. *Techniques de l'Ingénieur*, pp.IN186 v2. doi: <https://doi.org/10.51257/a-v2-in186>.

- Marsh, J. B., and Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7, 574–576. doi: 10.1016/S0022-2275(20)39274-9.
- Matsumoto, M., Mayama, S., Nemoto, M., Fukuda, Y., Muto, M., Yoshino, T., et al. (2014). Morphological and molecular phylogenetic analysis of the high triglyceride-producing marine diatom, *Fistulifera solaris* sp. nov. (Bacillariophyceae). *Phycol. Res.* 62, 257–268. doi: 10.1111/pre.12066.
- Matthijs, M., Fabris, M., Broos, S., Vyverman, W., and Goossens, A. (2016). Profiling of the early nitrogen stress response in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* reveals a novel family of RING-domain transcription factors. *Plant Physiol.* 170, 489–498. doi: 10.1104/pp.15.01300.
- McCarthy, J. K., Smith, S. R., McCrow, J. P., Tan, M., Zheng, H., Beerli, K., et al. (2017). Nitrate reductase knockout uncouples nitrate transport from nitrate assimilation and drives repartitioning of carbon flux in a model pennate diatom. *Plant Cell* 29, 2047–2070. doi: 10.1105/tpc.16.00910.
- Medlin, L. K. (2014). Evolution of the diatoms: VIII. Re-examination of the SSU-Rrna gene using multiple outgroups and a cladistic analysis of valve features. *J. Biodivers. Biopros. Dev.* 01. doi: 10.4172/2376-0214.1000129.
- Miyahara, M., Aoi, M., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y., and Ifuku, K. (2013). Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by multi-pulse electroporation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 874–876. doi: 10.1271/bbb.120936.
- Mock, T., Otilar, R. P., Strauss, J., McMullan, M., Paajanen, P., Schmutz, J., et al. (2017). Evolutionary genomics of the cold-adapted diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Nature* 541, 536–540. doi: 10.1038/nature20803.
- Moore, C. M., Mills, M. M., Arrigo, K. R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P. W., et al. (2013). Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geosci.* 6, 701–710. doi: 10.1038/ngeo1765.
- Moosburner, M. A., Gholami, P., McCarthy, J. K., Tan, M., Bielinski, V. A., and Allen, A. E. (2020). Multiplexed knockouts in the model diatom *Phaeodactylum* by episomal delivery of a selectable Cas9. *Front. Microbiol.* 11, 5. doi: 10.3389/fmicb.2020.00005.
- Moreira, D., and Deschamps, P. (2014). What was the real contribution of endosymbionts to the eukaryotic nucleus? Insights from photosynthetic eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016014–a016014. doi: 10.1101/cshperspect.a016014.
- Mus, F., Toussaint, J.-P., Cooksey, K. E., Fields, M. W., Gerlach, R., Peyton, B. M., et al. (2013). Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced

lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3625–3642. doi: 10.1007/s00253-013-4747-7.

N

Nawaly, H., Matsui, H., Tsuji, Y., Iwayama, K., Ohashi, H., Nakajima, K., et al. (2023). Multiple plasma membrane SLC4s contribute to external HCO₃⁻ acquisition during CO₂ starvation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Exp. Bot.* 74, 296–307. doi: 10.1093/jxb/erac380.

Nelson, D. M., Tréguer, P., Brzezinski, M. A., Leynaert, A., and 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 Biogeochem. Cycles* 9, 359–372. doi: 10.1029/95GB01070.

Niu, Y.-F., Wang, X., Hu, D.-X., Balamurugan, S., Li, D.-W., Yang, W.-D., et al. (2016). Molecular characterization of a glycerol-3-phosphate acyltransferase reveals key features essential for triacylglycerol production in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 60. doi: 10.1186/s13068-016-0478-1.

Niu, Y.-F., Yang, Z.-K., Zhang, M.-H., Zhu, C.-C., Yang, W.-D., Liu, J.-S., et al. (2012). Transformation of diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation and establishment of inducible selection marker. *BioTechniques* 52, 1–3. doi: 10.2144/000113881.

Niu, Y.-F., Zhang, M.-H., Li, D.-W., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Bai, W.-B., et al. (2013). Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a Type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs* 11, 4558–4569. doi: 10.3390/md11114558.

Nojima, D., Yoshino, T., Maeda, Y., Tanaka, M., Nemoto, M., and Tanaka, T. (2013). Proteomics analysis of oil body-associated proteins in the oleaginous diatom. *J. Proteome Res.* 12, 5293–5301. doi: 10.1021/pr4004085.

Nomaguchi, T., Maeda, Y., Liang, Y., Yoshino, T., Asahi, T., and Tanaka, T. (2018). Comprehensive analysis of triacylglycerol lipases in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* JPCD DA0580 with transcriptomics under lipid degradation. *J. Biosci. Bioeng.* 126, 258–265. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.03.003.

Nonoyama, T., Nojima, D., Maeda, Y., Noda, M., Yoshino, T., Matsumoto, M., et al. (2019). Proteomics analysis of lipid droplets indicates involvement of membrane trafficking proteins in

lipid droplet breakdown in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris*. *Algal Res.* 44, 101660. doi: 10.1016/j.algal.2019.101660.

Nunez, M., and Quigg, A. (2016). Changes in growth and composition of the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Nannochloropsis salina* in response to changing sodium bicarbonate concentrations. *J. Appl. Phycol.* 28, 2123–2138. doi: 10.1007/s10811-015-0746-7.

Nymark, M., Sharma, A. K., Sparstad, T., Bones, A. M., and Winge, P. (2016). A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Sci. Rep.* 6, 24951. doi: 10.1038/srep24951.

O

Olzmann, J. A., and Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 137–155. doi: 10.1038/s41580-018-0085-z.

Oudot-Le Secq, M.-P., Grimwood, J., Shapiro, H., Armbrust, E. V., Bowler, C., and Green, B. R. (2007). Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage. *Mol. Genet. Genomics* 277, 427–439. doi: 10.1007/s00438-006-0199-4.

P

Pan, Y., Hu, F., Yu, C., Li, C., Huang, T., and Hu, H. (2020). Amino acid catabolism during nitrogen limitation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Front. Plant Sci.* 11, 589026. doi: 10.3389/fpls.2020.589026.

Pančić, M., and Kiørboe, T. (2018). Phytoplankton defence mechanisms: traits and trade-offs: Defensive traits and trade-offs. *Biol. Rev.* 93, 1269–1303. doi: 10.1111/brv.12395.

Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L.-J., Bastien, O., Rébeillé, F., et al. (2014). Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways – From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Prog. Lipid Res.* 54, 68–85. doi: 10.1016/j.plipres.2014.02.001.

Połośka, A., Jasieniecka-Gazarkiewicz, K., You, L., Hao, X., Klińska, S., Gong, Y., et al. (2021). Diatoms and plants Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine Acyltransferases (LPCATs) exhibit diverse substrate specificity and biochemical properties. *IJMS* 22, 9056. doi: 10.3390/ijms22169056.

Popko, J., Herrfurth, C., Feussner, K., Ischebeck, T., Iven, T., Haslam, R., et al. (2016). Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE* 11, e0164673. doi: 10.1371/journal.pone.0164673.

Q

Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., and Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Res.* 28, 192–199. doi: 10.1016/j.algal.2017.11.004.

R

Rafa, N., Ahmed, S. F., Badruddin, I. A., Mofijur, M., and Kamangar, S. (2021). Strategies to produce cost-effective third-generation biofuel from microalgae. *Front. Energy Res.* 9, 749968. doi: 10.3389/fenrg.2021.749968.

Rampen, S. W., Abbas, B. A., Schouten, S., and Sinninghe Damste, J. S. (2010). A comprehensive study of sterols in marine diatoms (Bacillariophyta): Implications for their use as tracers for diatom productivity. *Limnol. Oceanogr.* 55, 91–105. doi: 10.4319/llo.2010.55.1.0091.

Rastogi, A., Maheswari, U., Dorrell, R. G., Vieira, F. R. J., Maumus, F., Kustka, A., et al. (2018). Integrative analysis of large scale transcriptome data draws a comprehensive landscape of *Phaeodactylum tricornutum* genome and evolutionary origin of diatoms. *Sci. Rep.* 8, 4834. doi: 10.1038/s41598-018-23106-x.

Rastogi, A., Vieira, F. R. J., Deton-Cabanillas, A.-F., Veluchamy, A., Cantrel, C., Wang, G., et al. (2020). A genomics approach reveals the global genetic polymorphism, structure, and functional diversity of ten accessions of the marine model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *ISME J.* 14, 347–363. doi: 10.1038/s41396-019-0528-3.

Remmers, I. M., D'Adamo, S., Martens, D. E., De Vos, R. C. H., Mumm, R., America, A. H. P., et al. (2018). Orchestration of transcriptome, proteome and metabolome in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during nitrogen limitation. *Algal Res.* 35, 33–49. doi: 10.1016/j.algal.2018.08.012.

Remmers, I. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., and Lamers, P. P. (2017). Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen starvation at different light intensities. *PLoS ONE* 12, e0175630. doi: 10.1371/journal.pone.0175630.

Roessler, P. G. (1988). Effects of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in the diatom *Cyclotella Cryptica*. *J. Phycol.* 24, 394–400. doi: 10.1111/j.1529-8817.1988.tb00189.x.

Rousseaux, C., and Gregg, W. (2013). Interannual variation in phytoplankton primary production at a global scale. *Remote Sens.* 6, 1–19. doi: 10.3390/rs6010001.

Ryall, K., Harper, J. T., and Keeling, P. J. (2003). Plastid-derived Type II fatty acid biosynthetic enzymes in chromists. *Gene* 313, 139–148. doi: 10.1016/S0378-1119(03)00671-1.

S

Sahoo, S., Mahapatra, S. R., Das, N., Parida, B. K., Rath, S., Misra, N., et al. (2020). Functional elucidation of hypothetical proteins associated with lipid accumulation: Prioritizing genetic engineering targets for improved algal biofuel production. *Algal Res.* 47, 101887. doi: 10.1016/j.algal.2020.101887.

Santinho, A., Salo, V. T., Chorlay, A., Li, S., Zhou, X., Omrane, M., et al. (2020). Membrane curvature catalyzes lipid droplet assembly. *Curr. Biol.* 30, 2481-2494.e6. doi: 10.1016/j.cub.2020.04.066.

Sato, N. (1992). Betaine lipids. *The botanical magazine = Shokubutsu-gaku-zasshi* 105, 185–197. doi: 10.1007/BF02489414.

Sayanova, O., Mimouni, V., Ulmann, L., Morant, A., Pasquet, V., Schoefs, B., et al. (2017). Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160407. doi: 10.1098/rstb.2016.0407.

Scarsini, M., Marchand, J., Manoylov, K. M., and Schoefs, B. (2019). “Photosynthesis in diatoms,” in *Diatoms: Fundamentals and Applications*, eds. J. Seckbach and R. Gordon (Wiley), 191–211. doi: 10.1002/9781119370741.ch8.

Scarsini, M., Thiriet-Rupert, S., Veidl, B., Mondeguer, F., Hu, H., Marchand, J., et al. (2022). The transition toward nitrogen deprivation in diatoms requires chloroplast stand-by and deep metabolic reshuffling. *Front. Plant Sci.* 12, 760516. doi: 10.3389/fpls.2021.760516.

Scarsini, M., Thurotte, A., Veidl, B., Amiard, F., Niepceron, F., Badawi, M., et al. (2021). Metabolite quantification by Fourier transform infrared spectroscopy in diatoms: proof of concept on *Phaeodactylum tricornutum*. *Front. Plant Sci.* 12, 756421. doi: 10.3389/fpls.2021.756421.

Schober, A. F., Rio Bartulos, C., Bischoff, A., Lepetit, B., Gruber, A., and Kroth, P. G. (2019). Organelle studies and proteome analyses of mitochondria and plastids fractions from the

- diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Cell Physiol.* 60, 1811–1828. doi: 10.1093/pcp/pcz097.
- Seo, S., Kim, J., Lee, J.-W., Nam, O., Chang, K. S., and Jin, E. (2020). Enhanced pyruvate metabolism in plastids by overexpression of putative plastidial pyruvate transporter in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* 13, 120. doi: 10.1186/s13068-020-01760-6.
- Sharma, N., Simon, D. P., Diaz-Garza, A. M., Fantino, E., Messaabi, A., Meddeb-Mouelhi, F., et al. (2021). Diatoms biotechnology: various industrial applications for a greener tomorrow. *Front. Mar. Sci.* 8, 636613. doi: 10.3389/fmars.2021.636613.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., and Roessler, P. (1998). A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae; close-out report. doi: 10.2172/15003040.
- Shemesh, Z., Leu, S., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Zarka, A., and Boussiba, S. (2016). Inducible expression of *Haematococcus* oil globule protein in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: association with lipid droplets and enhancement of TAG accumulation under nitrogen starvation. *Algal Res.* 18, 321–331. doi: 10.1016/j.algal.2016.07.002.
- Shu, Q., Pan, Y., and Hu, H. (2023). CGI-58 protein acts as a positive regulator of triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 1–9. doi: 10.4014/jmb.2209.09029.
- Siegler, H., Valerius, O., Ischebeck, T., Popko, J., Tourasse, N. J., Vallon, O., et al. (2017). Analysis of the lipid body proteome of the oleaginous alga *Lobosphaera incisa*. *BMC Plant Biol.* 17, 98. doi: 10.1186/s12870-017-1042-2.
- Smith, R., Jouhet, J., Gandini, C., Nekrasov, V., Marechal, E., Napier, J. A., et al. (2021). Plastidial acyl carrier protein $\Delta 9$ -desaturase modulates eicosapentaenoic acid biosynthesis and triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant J.* 106, 1247–1259. doi: 10.1111/tpj.15231.
- Song, Z., Lye, G. J., and Parker, B. M. (2020). Morphological and biochemical changes in *Phaeodactylum tricornutum* triggered by culture media: Implications for industrial exploitation. *Algal Res.* 47, 101822. doi: 10.1016/j.algal.2020.101822.
- Sørensen, K., Neufeld, T. P., and Simonsen, A. (2018). “Membrane trafficking in autophagy,” in *International Review of Cell and Molecular Biology*, ed. L. Galluzzi (Academic Press), 1–92. doi: 10.1016/bs.ircmb.2017.07.001.

Strassert, J. F. H., Irisarri, I., Williams, T. A., and Burki, F. (2021). A molecular timescale for eukaryote evolution with implications for the origin of red algal-derived plastids. *Nat Commun.* 12, 1879. doi: 10.1038/s41467-021-22044-z.

Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, Q.-Y., Zhang, L.-H., and Huang, H. (2019). Application of chemicals for enhancing lipid production in microalgae—a short review. *Bioresour. Technol.* 293, 122135. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122135.

Sun, Z., Chen, H., Sun, L., and Wang, Q. (2023). Converting carbon dioxide to high value-added products: Microalgae-based green biomanufacturing. *GCB Bioenergy* 15, 386–398. doi: 10.1111/gcbb.13031.

T

Tanaka, T., Maeda, Y., Veluchamy, A., Tanaka, M., Abida, H., Maréchal, E., et al. (2015). Oil accumulation by the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* as revealed by the genome and transcriptome. *Plant Cell* 27, 162–176. doi: 10.1105/tpc.114.135194.

Taparia, Y., Dolui, A. K., Boussiba, S., and Khozin-Goldberg, I. (2022). Multiplexed genome editing via an RNA polymerase II promoter-driven sgRNA array in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: insights into the role of StLDP. *Front. Plant Sci.* 12, 784780. doi: 10.3389/fpls.2021.784780.

Tesson, B., Gaillard, C., and Martin-Jézéquel, V. (2009). Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Bot. Mar.* 52. doi: 10.1515/BOT.2009.012.

Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsigos, K. D., et al. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat. Biotechnol.* 40, 1023–1025. doi: 10.1038/s41587-021-01156-3.

Thazar-Poulot, N., Miquel, M., Fobis-Loisy, I., and Gaude, T. (2015). Peroxisome extensions deliver the *Arabidopsis* SDP1 lipase to oil bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 4158–4163. doi: 10.1073/pnas.1403322112.

Thomas, D. M., Mechery, J., and Paulose, S. V. (2016). Carbon dioxide capture strategies from flue gas using microalgae: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 16926–16940. doi: 10.1007/s11356-016-7158-3.

Tirichine, L., and Bowler, C. (2011). Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth. *Plant J.* 66, 45–57. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04540.x.

Traller, J. C., Cokus, S. J., Lopez, D. A., Gaidarenko, O., Smith, S. R., McCrow, J. P., et al. (2016). Genome and methylome of the oleaginous diatom *Cyclotella cryptica* reveal genetic flexibility toward a high lipid phenotype. *Biotechnol. Biofuels* 9, 258. doi: 10.1186/s13068-016-0670-3.

Trentacoste, E. M., Shrestha, R. P., Smith, S. R., Gle, C., Hartmann, A. C., Hildebrand, M., et al. (2013). Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 19748–19753. doi: 10.1073/pnas.1309299110.

Tsai, C.-H., Uygun, S., Roston, R., Shiu, S.-H., and Benning, C. (2018). Recovery from N deprivation is a transcriptionally and functionally distinct state in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 176, 2007–2023. doi: 10.1104/pp.17.01546.

U

Ulmann, L., Blanckaert, V., Mimouni, V., Andersson, M. X., Schoefs, B., and Chenais, B. (2017). Microalgal fatty acids and their implication in health and disease. *MRMC* 17. doi: 10.2174/1389557516666160722132736.

Uwizeye, C., Decelle, J., Jouneau, P.-H., Flori, S., Gallet, B., Keck, J.-B., et al. (2021). Morphological bases of phytoplankton energy management and physiological responses unveiled by 3D subcellular imaging. *Nat. Commun.* 12, 1049. doi: 10.1038/s41467-021-21314-0.

V

Valenzuela, J., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K., Peyton, B. M., Bothner, B., et al. (2013). Nutrient resupplementation arrests bio-oil accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7049–7059. doi: 10.1007/s00253-013-5010-y.

Valenzuela, J., Mazurie, A., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K. E., Peyton, B. M., et al. (2012). Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* 5, 40. doi: 10.1186/1754-6834-5-40.

Van Tol, H. M., and Armbrust, E. V. (2021). Genome-scale metabolic model of the diatom *Thalassiosira pseudonana* highlights the importance of nitrogen and sulfur metabolism in redox balance. *PLoS ONE* 16, e0241960. doi: 10.1371/journal.pone.0241960.

Vanhercke, T., Dyer, J. M., Mullen, R. T., Kilaru, A., Rahman, Md. M., Petrie, J. R., et al. (2019). Metabolic engineering for enhanced oil in biomass. *Prog. Lipid Res.* 74, 103–129. doi: 10.1016/j.plipres.2019.02.002.

Vieler, A., Brubaker, S. B., Vick, B., and Benning, C. (2012). A lipid droplet protein of *Nannochloropsis* with functions partially analogous to plant oleosins. *Plant Physiol.* 158, 1562–1569. doi: 10.1104/pp.111.193029.

W

Waller, R. F., and Kořený, L. (2017). “Plastid complexity in Dinoflagellates: a picture of gains, losses, replacements and revisions,” in *Advances in Botanical Research* (Elsevier), 105–143. doi: 10.1016/bs.abr.2017.06.004.

Wältermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., et al. (2004). Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up: Lipid-body formation in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 55, 750–763. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04441.x.

Wang, X., Dong, H.-P., Wei, W., Balamurugan, S., Yang, W.-D., Liu, J.-S., et al. (2018). Dual expression of plastidial GPAT1 and LPAT1 regulates triacylglycerol production and the fatty acid profile in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* 11, 318. doi: 10.1186/s13068-018-1317-3.

Wang, X., Hao, T.-B., Balamurugan, S., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Dong, H.-P., et al. (2017). A lipid droplet-associated protein involved in lipid droplet biogenesis and triacylglycerol accumulation in the oleaginous microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 26, 215–224. doi: 10.1016/j.algal.2017.07.028.

Wang, X., Liu, S.-F., Li, R.-Y., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Lin, C. S. K., et al. (2020). TAG pathway engineering via GPAT2 concurrently potentiates abiotic stress tolerance and oleaginicinity in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* 13, 160. doi: 10.1186/s13068-020-01799-5.

Wang, X., Liu, Y.-H., Hu, D.-X., Balamurugan, S., Lu, Y., Yang, W.-D., et al. (2015). Identification of a putative patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) ortholog involved in lipid metabolism in microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 12, 274–279. doi: 10.1016/j.algal.2015.09.005.

Weiss, S. B., Kennedy, E. P., and Kiyasu, J. Y. (1960). The enzymatic synthesis of triglycerides. *J. Biol. Chem.* 235, 40–44. doi: 10.1016/S0021-9258(18)69581-X.

Winkler, U., and Stabenau, H. (1995). Isolation and characterization of peroxisomes from diatoms. *Planta* 195. doi: 10.1007/BF00202598.

Wong, D. M., and Franz, A. K. (2013). A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy. *J. Microbiol. Methods* 95, 122–128. doi: 10.1016/j.mimet.2013.07.026.

Wu, L. F., Chen, P. C., and Lee, C. M. (2013). The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 85, 506–510. doi: 10.1016/j.ibiod.2013.05.016.

X

Xia, S., Gao, B., Li, A., Xiong, J., Ao, Z., and Zhang, C. (2014). Preliminary characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* 12, 4883–4897. doi: 10.3390/md12094883.

Xie, F., Wang, J., and Zhang, B. (2023). RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Funct. Integr. Genomics* 23, 125. doi: 10.1007/s10142-023-01055-7.

Xie, W.-H., Pang, F., Niu, Y.-F., Zhang, M.-H., Yang, W.-D., Liu, J.-S., et al. (2013). Functional characterization of an ACCase subunit from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 60, 330–335. doi: 10.1002/bab.1091.

Xie, Y., Zheng, Y., Li, H., Luo, X., He, Z., Cao, S., et al. (2016). GPS-Lipid: a robust tool for the prediction of multiple lipid modification sites. *Sci. Rep.* 6, 28249. doi: 10.1038/srep28249.

Xu, D., Li, Y., Wu, L., Li, Y., Zhao, D., Yu, J., et al. (2018). Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J. Cell Biol.* 217, 975–995. doi: 10.1083/jcb.201704184.

Xue, J., Niu, Y.-F., Huang, T., Yang, W.-D., Liu, J.-S., and Li, H.-Y. (2015). Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation. *Metab. Eng.* 27, 1–9. doi: 10.1016/j.ymben.2014.10.002.

Y

Yang, J., Pan, Y., Bowler, C., Zhang, L., and Hu, H. (2016). Knockdown of phosphoenolpyruvate carboxykinase increases carbon flux to lipid synthesis in *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 15, 50–58. doi: 10.1016/j.algal.2016.02.004.

- Yang, M., Meng, Y., Chu, Y., Fan, Y., Cao, X., Xue, S., et al. (2018). Triacylglycerol accumulates exclusively outside the chloroplast in short-term nitrogen-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol.* 1863, 1478–1487. doi: 10.1016/j.bbali.2018.09.009.
- Yang, R., Wei, D., and Xie, J. (2020). Diatoms as cell factories for high-value products: chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin. *Crit. Rev. Biotechnol.* 40, 993–1009. doi: 10.1080/07388551.2020.1805402.
- Yang, Z.-K., Ma, Y.-H., Zheng, J.-W., Yang, W.-D., Liu, J.-S., and Li, H.-Y. (2014). Proteomics to reveal metabolic network shifts towards lipid accumulation following nitrogen deprivation in the diatom. *J. Appl. Phycol.* 26, 10. doi: 10.1007/s10811-013-0050-3.
- Yang, Z.-K., Niu, Y.-F., Ma, Y.-H., Xue, J., Zhang, M.-H., Yang, W.-D., et al. (2013). Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnol. Biofuels* 6, 67. doi: 10.1186/1754-6834-6-67.
- Yao, Y., Lu, Y., Peng, K.-T., Huang, T., Niu, Y.-F., Xie, W.-H., et al. (2014). Glycerol and neutral lipid production in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* promoted by overexpression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biotechnol. Biofuels* 7, 110. doi: 10.1186/1754-6834-7-110.
- Yoneda, K., Oishi, R., Yoshida, M., Matsuda, Y., and Suzuki, I. (2023). Stramenopile-type lipid droplet protein functions as a lipid droplet scaffold protein in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Cell Physiol.* 64, 803–813. doi: 10.1093/pcp/pcad040.
- Yoneda, K., Yoshida, M., Suzuki, I., and Watanabe, M. M. (2016). Identification of a major lipid droplet protein in a marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Cell Physiol.* 57, 397–406. doi: 10.1093/pcp/pcv204.
- Yoneda, K., Yoshida, M., Suzuki, I., and Watanabe, M. M. (2018). Homologous expression of lipid droplet protein-enhanced neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Appl. Phycol.* 30, 2793–2802. doi: 10.1007/s10811-018-1402-9.
- Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M., and Hu, Q. (2012). Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 24, 3708–3724. doi: 10.1105/tpc.112.100701.
- You, L., Jouhet, J., Maréchal, E., Amato, A., Hao, X., Zhang, D., et al. (2023). Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase from the unicellular diatom *Phaeodactylum tricorutum* (PtLPCAT1) is involved in triacylglycerol and galactoglycerolipid synthesis and

enhances eicosapentaenoic acid accumulation in recombinant oleaginous yeast. *Plant Biotechnol. J.* 21, 238–240. doi: 10.1111/pbi.13952.

Yu, G., Nakajima, K., Gruber, A., Rio Bartulos, C., Schober, A. F., Lepetit, B., et al. (2022). Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxylase contributes to carbon fixation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at low inorganic carbon concentrations. *New Phytol.* 235, 1379–1393. doi: 10.1111/nph.18268.

Z

Zhang, C., and Hu, H. (2014). High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation. *Mar. Genomics* 16, 63–66. doi: 10.1016/j.margen.2013.10.003.

Zhang, C., and Liu, P. (2019). The new face of the lipid droplet: lipid droplet proteins. *Proteomics* 19, 1700223. doi: 10.1002/pmic.201700223.

Zhang, H., Yin, W., Ma, D., Liu, X., Xu, K., and Liu, J. (2021a). Phytohormone supplementation significantly increases fatty acid content of *Phaeodactylum tricornutum* in two-phase culture. *J. Appl. Phycol.* 33, 13–23. doi: 10.1007/s10811-020-02074-8.

Zhang, J., Fan, N., and Peng, Y. (2018). Heat shock protein 70 promotes lipogenesis in HepG2 cells. *Lipids Health Dis.* 17, 73. doi: 10.1186/s12944-018-0722-8.

Zhang, R., Zhu, B., Tu, C., Li, Y., Zhao, Y., and Pan, K. (2021b). The combined effect of nitrogen deprivation and overexpression of malic enzyme gene on growth and lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Phycol.* 33, 3637–3645. doi: 10.1007/s10811-021-02587-w.

Zhang, Y., Pan, Y., Ding, W., Hu, H., and Liu, J. (2021c). Lipid production is more than doubled by manipulating a diacylglycerol acyltransferase in algae. *GCB Bioenergy* 13, 185–200. doi: 10.1111/gcbb.12771.

Zhu, B.-H., Zhang, R.-H., Lv, N.-N., Yang, G.-P., Wang, Y.-S., and Pan, K.-H. (2018). The role of malic enzyme on promoting total lipid and fatty acid production in *Phaeodactylum tricornutum*. *Front. Plant Sci.* 9, 826. doi: 10.3389/fpls.2018.00826.

Zienkiewicz, A., Zienkiewicz, K., Poliner, E., Pulman, J. A., Du, Z.-Y., Stefano, G., et al. (2020). The microalga *Nannochloropsis* during transition from quiescence to autotrophy in response to nitrogen availability. *Plant Physiol.* 182, 819–839. doi: 10.1104/pp.19.00854.

Zienkiewicz, K., and Zienkiewicz, A. (2020). Degradation of lipid droplets in plants and algae—right time, many paths, one goal. *Front. Plant Sci.* 11, 579019. doi: 10.3389/fpls.2020.579019.

Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., and Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Prog. Lipid Res.* 70, 1–16. doi: 10.1016/j.plipres.2018.03.001.

Liste des publications et communications

Articles scientifiques

A1 – Murison, V.; Hérault, J.; Schoefs, B.; Marchand, J.; Ulmann, L. Bioinformatics-Based Screening Approach for the Identification and Characterization of Lipolytic Enzymes from the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs* 2023, 21, 125.

A2 – Murison, V.; Hérault, J.; Côme, M.; Guinio, S.; Lebon, A.; Chamot, C.; Bénard, M.; Galas, L.; Schoefs, B.; Marchand, J.; Bardor, M.; Ulmann, L. Comparison of two *Phaeodactylum tricornutum* ecotypes under nitrogen starvation and resupply reveals distinct lipid accumulation strategies but a common degradation process. *Front. Plant Sci.* 2023, 14, 1257500.

A3 – Murison, V.; Hérault, J.; Guinio, S.; Côme, M.; Loiseau, C.; Kwasiborski, A.; Marchand, J.; Ulmann, L. Neutral lipid and chrysolaminarin metabolic pathways during nitrogen starvation and cell recovery in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (**En préparation pour soumission à *Algal Research***).

Communications orales

C1 – Murison, V.; Hérault, J.; Scarsini, M.; Schoefs, B.; Marchand, J.; Ulmann, L. Criblage par bio-informatique des enzymes lipolytiques dans les transcriptomes de la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum* lors d'un stress azoté. 40ème colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), 13-15/09/2022, Clermont-Ferrand, France.

C2 – Murison, V.; Hérault, J.; Côme, M.; Lebon, A.; Galas, L.; Schoefs, B.; Marchand, J.; Bardor, M.; Ulmann, L. Nitrogen resupply reveals a dynamic of lipid droplet fragmentation in the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. 19th EuroFed Lipid Congress, 17-20/09/2023 Poznan, Pologne.

Communications affichées

P1 – Murison, V. Comment brûler ses graisses quand on est une algue ? Forum Jeunes Chercheurs 2022 Le Mans Université, Concours « Expose ta thèse », 10/12/2022, Le Mans, France.

P2 – Murison, V. Réponses de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum* à une re-supplémentation en azote. Journées de l'École Doctorale VAAME, 28/06/2023, Angers, France.

Obtention du 2ème prix du poster

P3 – Murison, V.; Hérault, J.; Schoefs, B.; Marchand, J.; Ulmann, L. Genome Mining for *Phaeodactylum tricornutum* lipases. Towards the clarification of diatom lipid catabolism. 8th European Phycological Congress, 20-25/08/2023, Brest, France.

Titre : Réponses de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* à une carence azotée suivie d'une resupplémentation : dynamique de formation et de dégradation des lipides neutres chez les écotypes Pt1 et Pt4

Mots clés : *Phaeodactylum tricornutum*, diatomée, carence azotée, resupplémentation en azote, triglycéride, gouttelettes lipidiques, microscopie confocale, criblage génomique et transcriptomique

Résumé : Les diatomées sont des microalgues qui présentent une grande importance écologique. En réponse à des variations dans leur environnement, comme une carence en azote, elles réorientent leur métabolisme vers l'accumulation de triglycérides (TG) qui sont stockés dans des gouttelettes lipidiques (LD). La variation de composition de leur biomasse en réponse à des stress abiotiques a attiré l'attention pour leur valorisation économique. Cependant, les stress induisent également un arrêt de croissance ce qui limite la productivité de ces approches. Pour augmenter cette productivité, la plupart des recherches se sont concentrées sur l'augmentation des voies de synthèse des lipides. Toutefois, certaines études ont également démontré que l'inactivation des voies de dégradation était une approche prometteuse, bien que chez les diatomées, ces voies soient mal connues. La plupart des recherches centrées sur le métabolisme des lipides des diatomées ont étudié le modèle *Phaeodactylum tricornutum*. Cette espèce comporte différents écotypes, isolés à différents endroits du globe, dont notamment les écotypes Pt1 et Pt4 fréquemment étudiés et génétiquement distants. De précédentes études ont en outre souligné que ces écotypes présentaient des phénotypes différents d'accumulation des lipides. Les objectifs principaux de cette thèse ont donc été d'une part de caractériser les réponses de ces deux écotypes pendant une carence azotée qui induit l'accumulation de lipides, et d'autre part d'obtenir une meilleure compréhension des processus de dégradation des lipides mis en place après resupplémentation des cultures carencées. Les cultures ont été caractérisées via plusieurs approches. La microscopie confocale a montré que le volume total des LD augmentait tandis que le volume du plaste diminuait en carence, avec une réponse inverse et plus rapide après resupplémentation, soutenant le recyclage d'éléments du plaste pendant la carence.

Les deux écotypes ont montré des stratégies d'accumulation différentes, soulignant des différences phénotypiques également détectées au niveau de la physiologie photosynthétique et du volume cellulaire. Toutefois, 24 heures après retour de l'azote, les deux écotypes montrent une dynamique similaire de fragmentation des LDs avant de retourner à une situation proche de l'état non carencé en 72 heures. En se concentrant sur la fragmentation, un changement de localisation de certaines LDs a été observé, ce qui suggère un éloignement par rapport au plaste, pouvant signifier l'implication de la lipophagie, l'un des deux mécanismes de dégradation des lipides connus chez les eucaryotes avec la lipolyse. Les analyses de biochimie ont affiné ces observations avec la mise en évidence, en plus de la dynamique des lipides, d'une dynamique des glucides solubles qui sont rapidement accumulés en carence et consommés dès 12 heures après retour de l'azote. Une mesure de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des glucides a été conduite mettant en évidence certaines isoformes particulièrement régulées par la transition entre carence et resupplémentation. Certains gènes étaient régulés de manière différente entre Pt1 et Pt4, soulignant leurs différences de réponse phénotypique. Pour pouvoir choisir les gènes à étudier concernant la dégradation des lipides, un criblage bioinformatique a été conduit permettant d'identifier 8 lipases candidates. L'analyse de la régulation des transcrits correspondants a montré que l'une d'entre elles (Phatr3_EG02408) était surexprimée chez les deux écotypes après retour de l'azote soulignant son possible rôle dans cette réponse. Une étude fonctionnelle de cette enzyme pourra être couplée à une étude de l'importance relative de la lipolyse et de la lipophagie.

Title: Responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to nitrogen starvation followed by a resupply: dynamics of neutral lipid production and degradation in ecotypes Pt1 and Pt4

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*, diatom, nitrogen deficiency, nitrogen resupply, triglyceride, lipid droplets, confocal microscopy, genomic and transcriptomic screening

Abstract: Diatoms are microalgae of great ecological relevance. As a response to variations in their environment, such as a nitrogen deficiency, they reorient their metabolism towards the accumulation of triglycerides (TG) that are stored inside lipid droplets (LD). The variation in their biomass composition as a response to abiotic stress has caught attention for their commercial use. However, stress also induces an arrest in growth which limits the productivity of these approaches. To increase this productivity, most research have focused on enhancing lipid synthetic pathways. Yet, some studies have also demonstrated that inactivation of degradation pathways was a promising approach, although, in diatoms, these pathways are poorly described. Most studies focusing on diatom lipid metabolism have used the model *Phaeodactylum tricornutum*. This species comprises various ecotypes, isolated all around the world, including the frequently studied and genetically distant Pt1 and Pt4. Previous reports have also emphasized that these ecotypes displayed different lipid accumulation phenotypes. The main aims of this PhD thesis were therefore to characterize on the one hand the responses of these two ecotypes during a nitrogen starvation that induces lipid accumulation, and, on the other hand to gain a better understanding of the lipid degradation processes that take place after resupply of starved cultures. The cultures were characterized using several approaches. Confocal microscopy showed that total LD volume increased while plastid volume decreased under starvation, with an inverse and faster response after re-supplementation, supporting the recycling of plastid elements during starvation.

The two ecotypes showed different accumulation strategies, highlighting phenotypic differences also detected through photosynthetic physiology and cell volume analyses. However, 24 hours after resupplying nitrogen, both ecotypes experience similar dynamics of LD fragmentation before returning to a situation close to the nitrogen replete state within 72 hours. Focusing on fragmentation, a change in the localization of specific LDs was observed, suggesting a movement away from the plastid, possibly indicating the action of lipophagy, one of the two known lipid degradation mechanisms in eukaryotes along with lipolysis. Biochemical analyses have refined these observations, revealing that, in addition to lipid dynamics, a variation in soluble carbohydrates that are rapidly accumulated under starvation and consumed as early as 12 hours after nitrogen resupply. The expression of genes involved in lipid and carbohydrate metabolism was also measured, highlighting certain isoforms that are particularly regulated by the transition between starvation and resupply. Some genes were regulated differently between Pt1 and Pt4, supporting their differential phenotypic response. To select target genes involved in lipid degradation, a bioinformatic screening was carried out, allowing the identification of 8 candidate lipases. Analysis of the regulation of the corresponding transcripts showed that one of them (Phatr3_EG02408) was overexpressed in both ecotypes after resupplying nitrogen, highlighting its possible role in this response. A functional study of this enzyme shall be conducted, coupled to a study of the relative importance of lipolysis and lipophagy