

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Badji Mokhtar Annaba University

جامعة باجي مختار – عنابة

**Université Badji Mokhtar
Annaba**



Faculté des Sciences

كلية العلوم

Département de Biologie

قسم البيولوجيا

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de

Doctorat Troisième Cycle

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Toxicologie Environnementale

Par :

BENAMARA SARAH

Thème :

**Caractérisation membranaire et cellulaire d'un bio-indicateur des milieux
aquatiques *Ostreococcus Tauri***

Thèse soutenue le 04/06/2026 devant le jury composé de :

N°	Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
01	Berrebah Houria	Prof.	Université Badji Mokhtar -Annaba	Président
02	Sbartai Ibtissem	Prof	Université Badji Mokhtar -Annaba	Rapporteur
03	Bouhacina Touria	Prof	Université de Bordeaux	Co-rapporteur
04	Khati Wilya	Prof	Université Chadli Benjedid-El tarf	Examineur

05	Issaad Ghazlene	MCA	Université Badji Mokhtar -Annaba	Examineur
06	Gaubry-Hewang Christine	Prof	Université de Bordeaux	Membre invité

The word "Merci" is written in a cursive, handwritten style in black ink. To the right of the word, the tip of a black pen is visible, as if it has just finished writing the word.

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué en collaboration entre l'université Badji Mokhtar de Annaba (Algérie) et l'université de Bordeaux (France) et plus précisément entre le **Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC)** et le **Laboratoire Ondes et Matières d'Aquitaine (LOMA)**. Je tiens ainsi à exprimer ma profonde gratitude aux deux directeurs de m'avoir accueillie au sein leur laboratoire et pour la confiance qu'ils m'ont accordée tout au long de ce parcours.

Je suis particulièrement reconnaissante de m'avoir offert un environnement scientifique d'une grande richesse, propice à la réflexion, à l'échange et à l'épanouissement

intellectuel. La qualité des infrastructures, ainsi que le dynamisme et l'excellence des équipes du LOMA, ont constitué un cadre idéal pour mener à bien mes recherches dans les meilleures conditions. Je souhaite également souligner l'importance de son soutien institutionnel, de sa bienveillance et de son engagement envers les jeunes chercheurs. Sa vision et son implication dans le développement du laboratoire ont largement contribué à faire de cette expérience un moment déterminant de mon parcours académique et professionnel.

Je tiens à exprimer mes plus chaleureux et sincères remerciements à Madame la Professeure **Touria Bouhacina-Cohen**, co-directrice de cette thèse à l'Université de Bordeaux, pour son encadrement précieux tout au long de ce travail. Je lui suis profondément reconnaissante pour sa disponibilité, son écoute et son accompagnement constant à chaque étape de cette thèse. Ses conseils avisés, sa rigueur scientifique et son exigence m'ont permis de progresser et de mener à bien ce projet dans les meilleures conditions. Au-delà de son encadrement académique, je tiens à souligner sa bienveillance, son soutien et la confiance qu'elle m'a accordée. Elle a su me guider avec patience et encouragement, même dans les moments les plus difficiles, ce qui a été d'un apport inestimable dans l'aboutissement de ce travail.

Qu'elle soit ici le reflet de ma plus profonde gratitude et de mon plus grand respect.

C'est avec une émotion toute particulière que j'adresse mes remerciements les plus profonds et les plus chaleureux à Madame la Professeure **Sbartai Ibtissem**, co-directrice de cette thèse à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba. Je lui suis infiniment reconnaissante pour sa présence constante, discrète mais toujours rassurante, ainsi que pour son écoute sincère et attentive. Elle a su m'accompagner avec une douceur rare, trouvant toujours les mots apaisants et encourageants qui redonnent confiance et permettent d'avancer, même dans les moments les plus délicats. Son soutien indéfectible, sa patience et sa grande bienveillance ont

été pour moi une véritable source de force tout au long de ce parcours. Elle a su créer un cadre empreint d'humanité, de respect et de compréhension, dans lequel j'ai pu évoluer avec sérénité. Au-delà de son rôle académique, je garderai le souvenir d'une personne profondément humaine, attentive aux autres et sincèrement investie, qui a marqué ce parcours d'une empreinte aussi précieuse qu'inoubliable. Qu'elle veuille bien recevoir ici le témoignage de ma gratitude la plus sincère, de mon profond respect, ainsi que de toute mon affection pour l'accompagnement remarquable qu'elle m'a apporté.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Madame **Christine Grauby-Heywang**, Professeure à l'Université de Bordeaux, pour la qualité exceptionnelle de son encadrement et pour sa grande générosité scientifique tout au long de ce travail. Je lui suis profondément reconnaissante pour m'avoir initiée à la méthode de Langmuir-Blodgett, ainsi qu'à plusieurs autres techniques expérimentales essentielles, qu'elle m'a transmises avec rigueur, patience et pédagogie. Ses conseils avisés, sa disponibilité constante et son exigence scientifique ont été d'une aide précieuse dans la réalisation de cette thèse. Je souhaite également la remercier chaleureusement pour le temps qu'elle a consacré à la relecture et à la correction de ce manuscrit. Ses remarques pertinentes, sa précision et son souci du détail ont permis d'améliorer considérablement la qualité de ce travail. Au-delà de ses compétences scientifiques remarquables, j'ai particulièrement apprécié son soutien, sa bienveillance et son engagement auprès des étudiants. Travailler à ses côtés a été une expérience extrêmement enrichissante, tant sur le plan scientifique qu'humain.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance et mon plus grand respect.

Je tiens aussi à remercier Madame **Florence Corellou**, Docteure au laboratoire de Biogenèse Membranaire, pour son aide précieuse dans le cadre de ce travail. Je lui suis

particulièrement reconnaissante de m'avoir fourni la picoalgue *Ostreococcus tauri*, élément essentiel à la réalisation de mes recherches. Sa contribution a été déterminante pour l'avancement et la concrétisation de cette étude.

Je tiens à adresser mes plus sincères et respectueux remerciements à Madame la Professeure **Sbartai Hana**, Directrice de la formation doctorale, pour l'accompagnement attentif et constant dont elle a fait preuve tout au long de mon parcours universitaire. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée dans la gestion des démarches administratives, souvent complexes et exigeantes. Grâce à son efficacité, sa rigueur et sa parfaite maîtrise des procédures, elle a su grandement faciliter toutes les étapes administratives, me permettant ainsi de me consacrer plus sereinement à mon travail de recherche. Au-delà de cet aspect, je tiens à souligner la qualité de son encadrement et la pertinence de ses orientations. Ses conseils éclairés, sa disponibilité et son sens de l'écoute ont été d'un soutien considérable dans mon évolution académique et personnelle. Elle a su créer un climat de confiance et d'encouragement, indispensable à la réussite d'un parcours doctoral.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon plus grand respect pour son investissement et son rôle déterminant dans mon cheminement universitaire.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Madame la Directrice du laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université Badji Mokhtar d'Annaba le Professeure **Berrebbah-Djebar Houria**, non seulement pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire mais aussi en me faisant l'honneur de présider mon jury de thèse et pour l'intérêt qu'elle a porté à mes travaux.

Je souhaite également remercier Madame **Khati Wilia** Professeur à l'université de Chadli Benjedid El-Tarf et Madame Isaad Ghazlene Maître de conférences de l'université de Annaba, pour avoir accepté d'évaluer ce travail doctoral et de participer à ce jury de thèse.

Je tiens par la même occasion à remercier les deux étudiants en Licence **Solène Prudhomme** et **Arthur Brisseau** d'avoir contribué aux manips de finalisation de mon article.

Au-delà de l'aspect scientifique, je garderai un souvenir précieux de l'atmosphère chaleureuse et stimulante qui règne au sein du LOMA, favorisant non seulement la rigueur et l'excellence, mais aussi l'entraide et la collaboration. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect pour son rôle déterminant dans l'aboutissement de ce travail.

توصيف الغشاء والخلوية لمؤشر حيوي للبيئات المائية ودراسة السمية

المحتملة للملوث الكيميائي

ملخص

تعتبر الأغشية الثايلاكويدية الموقع الأساسي لعمليات التركيب الضوئي، تتميز بتركيب دهني غير مألوف تهيمن عليه الغلاكتوليبيدات، وبشكل خاص المونوجالاكتوسيل دياسيل غليسيرول والديجالاكتوسيل دياسيل غليسيرول. تمنح هذه الدهون، ذات درجة التشبع العالية، الأغشية مرونة بنيوية وقدرة كبيرة على التكيف مع التغيرات البيئية. ومع ذلك، لا تزال العلاقة بين البنية الجزيئية لهذه الدهون وخصائصها الفيزيائية الحيوية ووظيفتها داخل الأغشية الضوئية غير مفهومة تماماً، خصوصاً في الطحالب الدقيقة من نوع O ستريوجوجوس تاوري التي تُعدّ نموذجاً بسيطاً للكائنات حقيقية النواة.

يهدف هذا العمل إلى دراسة الخصائص الفيزيائية الحيوية وبنية الأغشية الثايلاكويدية لطحلب. تاوري بغية فهم تأثير تركيبها الدهنية على استقرار الأغشية وديناميكيته. كما يسعى إلى تقييم التحولات البنيوية للجلاكتوليبيدات تحت تأثير الضغط ودراسة أثر التفاعلات بين الدهون والمواد الغريبة) خ نوبيوتيقويس (على التنظيم الغشائي باستخدام نماذج تركيبية.

اعتمدت هذه الدراسة على منهجية مزدوجة تجمع بين المجهر الذري للقوة وتقنية أفلام لانغمير-بلودجيت لدراسة سلوك. أظهرت النتائج أنّ هذه الدهون تُكوّن طبقات أحادية مستقرة في الطور السائل المتمدّد، لكنها تُظهر سلوكاً مختلفاً عند تعريضها للضغط. فقد بيّن التحليل أنّ، ذو الشكل المخروطي وغير الثنائي الطبقة، يعاني من عدم استقرار متزايد نتيجة أكسدة سلسله الهيدروكربونية وانفصال بعض الجزيئات عن مستوى الطبقة، في حين أظهر ض، ذو الشكل الأسطواني، تماسكاً واستقراراً أعلى. تشير هذه الاختلافات البنيوية إلى دور أساسي لـ في مرونة الأغشية الثايلاكويدية وديناميكيته، وهي خصائص ضرورية لكفاءة الأنظمة الضوئية في تحويل الطاقة.

تُعدّ هذه النتائج أساساً علمياً متيناً لدراسات مستقبلية حول تفاعلات الدهون-البروتينات واستجابة الأغشية للمعادن الثقيلة والملوثات، كما تفتح آفاقاً تطبيقية واعدة في مجالات التكنولوجيا الحيوية والمعالجة الحيوية)

الكلمات المفتاحية: ستريوجوجوس تاوري؛ الجلاكتوليبيدات، الثايلاكويدات؛ لانغمير-بلودجيت؛ المجهر الذري للقوة؛

الخصائص الفيزيائية الحيوية؛ الأغشية الضوئية؛ استقرار الأغشية

Caractérisation membranaire et cellulaire d'un bio-indicateur des milieux aquatiques et étude de la toxicité potentielle d'un contaminant chimique

Résumé

Les membranes thylakoïdales, lieux cruciaux de la photosynthèse, possèdent une composition lipidique atypique dominée par les galactolipides monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et digalactosyldiacylglycérol (DGDG). Ces lipides, fortement insaturés, donnent aux membranes une plasticité et une capacité d'adaptation remarquables face aux changements environnementaux. Cependant, les relations entre leur structure moléculaire, leurs propriétés biophysiques et leur rôle fonctionnel dans les membranes photosynthétiques restent encore partiellement flou, notamment chez les pico-algues telles que *Ostreococcus tauri*, modèle minimaliste d'eucaryote photosynthétique. L'objectif principal de cette thèse est de caractériser les propriétés biophysiques et la structure des membranes thylakoïdales de *Ostreococcus tauri* afin de mieux assimiler le rôle de leur composition lipidique dans la stabilité et la réactivité membranes. Mais aussi évaluer la stabilité et les transitions structurales des lipides sous contrainte de compression et analyser l'influence des interactions lipides-xénobioque sur la structure membranaire à travers des modèles synthétiques. Une étude combinant microscopie à force atomique (AFM) et films de Langmuir-Blodgett a été

adopté afin d'étudier le comportement de MGDG et DGDG sous compression. Les résultats ont prouvé que les lipides MGDG et DGDG forment des monocouches stables en phase liquide expansée (LE), mais présentent des comportements distincts sous compression. Le MGDG, de nature conique et non bilayère, manifeste une instabilité accrue liée à l'oxydation de ses chaînes hydrophobes et à la désorption moléculaire hors du plan de la monocouche. Le DGDG, de forme cylindrique, montre une meilleure cohésion et une plus grande stabilité. Ces différences structurales se traduisent par une propension variable à la formation de phases polymorphes, suggérant un rôle clé du MGDG dans la flexibilité et la plasticité des membranes thylakoïdales, caractéristiques importantes des systèmes de conversion d'énergie. Ces résultats constituent une base solide pour des études futures sur les interactions lipides–protéines et sur la réponse membranaire aux métaux lourds, ouvrant des perspectives vers des applications en biotechnologie environnementale et bioremédiation.

Mots-clés : *Ostreococcus tauri*, galactolipides, MGDG, DGDG, Thylakoïdes, Langmuir-Blodgett, AFM, propriétés biophysiques, membranes photosynthétiques, stabilité membranaire.

Membrane and cellular characterization of a bio-indicator of aquatic environments and study of the potential toxicity of a chemical contaminant

Abstract

Thylakoid membranes, which host the core reactions of photosynthesis, are characterized by an unusual lipid composition dominated by the galactolipids monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG). These highly unsaturated lipids provide the membranes with remarkable flexibility and adaptive capacity under environmental fluctuations. However, the relationships between their molecular structure, biophysical properties, and functional roles within photosynthetic

membranes remain only partially understood, particularly in picoalgae such as *Ostreococcus tauri*, considered a minimalist model of photosynthetic eukaryote. The main objective of this thesis is to characterize the biophysical properties and structural organization of the thylakoid membranes of *O. tauri* in order to better understand the influence of lipid composition on membrane stability and reactivity. It also aims to evaluate the structural transitions of galactolipids under compression stress and to analyze the effect of lipid–xenobiotic interactions on membrane organization using synthetic models. An integrated approach combining Atomic Force Microscopy (AFM) and Langmuir–Blodgett film techniques was employed to study the behavior of MGDG and DGDG. The results showed that both lipids form stable monolayers in the liquid-expanded (LE) phase but exhibit distinct responses under compression. MGDG, with its conical and non-bilayer geometry, displays increased instability due to oxidation of its hydrophobic chains and molecular desorption out of the monolayer plane. Conversely, DGDG, of cylindrical shape, exhibits stronger cohesion and greater mechanical stability. These structural differences lead to varying tendencies to form polymorphic phases, suggesting a key role of MGDG in membrane flexibility and dynamic rearrangements—essential properties for efficient photosynthetic energy conversion systems.

This work provides a robust experimental framework for future studies on lipid–protein interactions and the response of membranes to heavy metals and xenobiotics, offering new perspectives for environmental biotechnology and bioremediation applications.

Keywords: *Ostreococcus tauri*; galactolipids; MGDG; DGDG; thylakoid membranes; Langmuir–Blodgett; AFM; biophysical properties; photosynthetic membranes; membrane stability.

Table Des Matières

<i>Liste Des Tableaux</i>	<i>I</i>
<i>Liste Des Figures</i>	<i>II</i>
<i>Liste Des Symboles</i>	<i>III</i>

Introduction	générale
.....	1
I. Etat de l'art.....	6
I.1. Généralités sur les microalgues.....	7
I.2. Critères de classification des algues.....	8
I.3. Diversité et classification	8
I.4. Description des différentes classes d'algues	8
I.4.1. Procaryotes photosynthétiques	9
I.4.2. Eucaryotes photosynthétiques	9
I.5. Croissance des microalgues	12
I.5.1. Phase de latence.....	12
I.5.2 .Phase exponentielle.....	12
I.5.3 Phase de déclin.....	12

I.6. Reproduction des microalgues	13
I.6.1. Reproduction asexuée.....	13
I.6.2. Reproduction sexuée.....	13
I.7. Culture des microalgues	14
I.7.1. Milieu de culture.....	14
I.7.2. Les conditions de culture	14
I.7.3. Système de culture.....	15
1.8. Phylogénie des microalgues eucaryotes du phytoplancton	17
1.9. La membrane cellulaire	19
1.9.1. Rappels historiques et évolution du modèle de membrane.....	19
1.9.2. Composition moléculaire	21
1.9.3. Les lipides membranaires.....	22
I.10. Les glycérophospholipides ou phospholipides.....	22
I.11. Les sphingolipides.....	22
I.12. Les galactolipides.....	23
1.12.1. Structure	24
1.12.1. Applications et marchés potentiels des micro-algues	26
I.12.2. Applications environnementales (traitement des eaux usées)	26
I.13. Production de molécules à haute valeur ajoutée	27
I.13.1. Les pigments.....	27
I.13.2. Les caroténoïdes	27
I.13.3. Lipides et Acides gras polyinsaturés	28

I.13.4. Polysaccharides	29
I.13.5. Substances bioactives	29
I.14. Le plancton, acteur majeur de notre écosystème.....	30
I.14.1. Diversité des organismes planctoniques.....	30
I.14.2. Interactions entre le plancton et l'environnement.....	31
I.14.3. Le zooplancton produit également du CO ₂ par respiration.....	33
I.14.4. Cycle de vie du phytoplancton	34
I.14.5. Phylogénie des Mamiellales	35
I.14.6. Biogéographie des Mamiellales.....	38
I.14.7. Applications effectuées sur les Mamiellales.....	39
II. Matériel et méthodes	43
II.1. Souches de microalgues utilisées.....	44
II.1.1. Conditions de culture	44
II.2. Méthodes biochimiques	45
II.2.1. Obtention de l'extrait lipidique	45
II.2.2. Récolte de la biomasse à étudier (extrait lipidique)	47
II.3. Méthode d'observation	48
II.4. Lipides algaux étudiés.....	49
II.4.1. Préparation des solutions lipidiques.....	50
II.5. Etude sur la cuve de Langmuir	50
II.5.1. Pression de surface	51
II.5.2. Isotherme théorique d'un lipide	53

1. Introduction	60
2. Matériels et Méthodes	61
2.1. Matériels	61
2.2. Indice de double liaison (DBI) du MGDG et du DGDG	62
2.3. Mesures de pression de surface et transfert Langmuir-Blodgett	63
2.4. Microscopie à Force Atomique (AFM)	64
3. Résultats	65
4. Discussion	73
III. Résultats	79
III.1. Caractérisation du modèle biologique par microscopie optique	79
III.2. Caractérisation du modèle biologique par AFM	80
III.3. Comparaison des résultats obtenus par la microscopie optique (MO) et la microscopie à force atomique (AFM) sur <i>Ostreococcus tauri</i>	82
III.3.1. Observations générales à l'aide du microscope optique.....	83
III.3.2. Observations minutieuses en microscopie à force atomique	83
III.4. Présentation des résultats issus de l'expérience C :18 (ot5).....	84
III.4.1. Analyse morphologique et biophysique.....	85
 <i>Conclusion générale et perspectives</i>	 98
 <i>Références Bibliographiques</i>	 101

Liste des Tableaux

N°	TITRES	PAGES
01	Composition lipidique de la membrane des chloroplastes végétaux (MGDG, DGDG, SQDG, PG). Tiré de la revue de Kobayashi (2016)	29

Liste des Figures

N°	TITRES	PAGES
01	Arbre phylogénétique des principales lignées vertes, en particulier aquatiques, basé sur des évidences moléculaires (Leliaert et al, 2011)	50
02	Structure des lipides étudiés et % dans les membranes thylakoïdes	64
03	Cuve de Langmuir vue de profil et technique de transfert Langmuir-Blodgett (Faye N.R, 2014)	66
04	Modèle général d'isotherme de compression d'une monocouche lipidique (Faye N.R, 2014)	70

05	À gauche schéma du dispositif d'AFM ; à droite le système pointe-microlevier assimilable à un ressort (Faye N.R., 2014)	73
06	Modèle de courbe de force	77
07	La picoalgue <i>Ostreococcus tauri</i> par microscopie optique (MO) (S. Benamara, 2021)	93
08	Images AFM de <i>Ostreococcus tauri</i> (D. Benamara, 2022)	95
09	[Titre provisoire à valider par l'auteure]	100
10	Images AFM de l'échantillon Ot5, mode Tapping à l'air (S.Benamara, 2022)	100

Liste des Symboles

Δ : Delta

ω : oméga

A

aa : acides aminés

AAPT : aminoalcool phosphotransférase

ACCase : acétyl-CoA carboxylase

ACP : protéine transporteur de chaînes acyles (pour 'acyl carrier protein')

ALA : acide α -linoléique (18:3 Δ 9,12,15 n-3)

ARA : acide arachidonique (20:4 Δ 5,8,11,14 n-6)

B

BL : bétaine-lipide

BHT : hydroxytoluène butylé

C

CCA1 : CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1

cDNA : ADN complémentaire

CDP-DAG : cytidine diphosphate-diacylglycérol

CDS : CTP phosphatidate cytidyltransferase ou CDP-DAG synthase

CoA : Coenzyme A

CS : Score chloroplastidial

Cytb5 : cytochrome b5

D

DAG : diacylglycérol

DGCC : diacylglycéryl-carboxyhydrométhylcholine

DGAT : acyl-CoA:diacylglycérol acyltransférase

DGDG : digalactosyldiacylglycérol₆

DGDS : DGDG-synthase

DGLA : acide γ -linolénique (18:3 Δ 6,9,12 n-6)

DGHS, diacylglycérylhomosérine

DGTA : diacylglycérylhydroxyméthyltriméthyl- β -alanine

DGTS : diacylglycéryltriméthylhomosérine

DHA : acide docosahexaénoïque (22:6 Δ 4,7,10,13,16,19 n-3)

DPA : acide docosapentaénoïque (22:5 Δ 7,10,13,16,19 n-3)

DO : densité optique

E

Elo : élongases

ENR : énoyl-ACP réductase

EPA : acide eicosapentaénoïque (20:5 Δ 5,8,11,14,17 n-3)

ETA : acide eicosatetraénoïque (20:5 Δ 8,11,14,17 n-3)

ESI-MS : spectrométrie de masse à ionisation par électrospray

F

FA : acide gras (pour 'fatty acid')

FAD : FA-désaturases

FAE : FA-élongases

FAT : acide gras-ACP thioestérase

FFA : acides gras libres (pour 'free fatty acids')

FAMES : esthers méthylés d'acides gras

FAS : enzyme de synthèse des acides gras (pour 'fatty acid synthase')

FSC : paramètre de taille (pour 'pour Forward scatter')

G

G : gentamycine

G3P : glycérol-3-phosphate

GC-FID : chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme

GLA : acide γ -linolénique (18:3 Δ 6,9,12 n-6)

GGGT : galactolipide:galactolipide galactosyltransférase

GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase

H

HAPT : transporteur à haute affinité pour le phosphate (pour 'high affinity phosphate transporter')

HD : 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase

HP : haute performance

HU : hydroxyurée

K

KAS : 3-kétoacyl-ACP synthase

L

LA : acide linoléique (18:2 Δ 9,12 n-3)

LACS : acyl à longue chaîne-CoA synthétase

LL : lumière continue

LN : lipides neutres

LPA : acide lysophosphatidique

LPAAT : acide lysophosphatidique acyltransférase

M

MAG : 2-monoacylglycérol

Met : méthionine

MGAT : monoacylglycérol acyltransférase

MGDG : monogalactosyldiacylglycérol

MGDS : MGDG-synthase

O

OPA : acide octadécapentaénoïque (18:5 Δ 3,6,9,12,15, n-3)

Introduction générale

Une proportion significative de la biomasse aquatique est constituée par les protistes eucaryotes. À ce jour, on a identifié 127 000 espèces d'algues, dont la majorité sont des microalgues. Il existe encore de nombreuses espèces qui n'ont pas été identifiées ou étudiées. Par ailleurs, les microalgues se sont établies dans divers environnements marins, d'eau douce et terrestres, démontrant ainsi leur capacité d'adaptation à de nombreuses conditions environnementales. Ils sont capables de s'acclimater à toutes les conditions climatiques, des plus basses températures aux plus élevées. L'abondance variée des espèces de microalgues offre une multitude d'opportunités d'application. Néanmoins, en dépit de cette vaste variété, seulement une dizaine d'espèces de microalgues ont été cultivées à grande échelle. Trois d'entre elles dominent : l'Arthrospira (Spirulina), la Chlorella et la Dunaliella.

Les microalgues, organismes photosynthétiques, possèdent de nombreuses propriétés biochimiques attrayantes pour une vaste gamme d'applications dans divers secteurs tels que : l'alimentation humaine et animale, la production d'énergie (biocarburants), ainsi que la fabrication de molécules à forte valeur ajoutée destinées à des usages industriels, en particulier dans les secteurs pharmaceutiques et cosmétiques.

Dès les années 1940, une grande attention a été portée aux États-Unis, en Allemagne et au Japon sur la culture des microalgues dans l'objectif de produire des protéines. Cela rappelle l'étude extensive menée par le laboratoire NREL aux États-Unis dans les années 80, visant à déterminer les espèces de microalgues les plus prometteuses pour la production de lipides (Rengel, 2010). L'usage de microalgues suscite une fascination grandissante. Certaines microalgues, grâce à leur pouvoir métabolique, se positionnent comme des leaders dans le développement de bioprocédés.

De nombreuses applications ont été mises au point, telles que : la fabrication de biodiesel, la capture du CO₂ issu des émissions polluantes, le traitement des eaux usées via la bioaccumulation de métaux lourds, etc. Au cours des dix dernières années, de nombreuses recherches (Negoro et al, 1991) ont été menées sur le potentiel des microalgues à générer des substances de grande valeur grâce à la photosynthèse, ainsi que leur capacité à bioaccumuler et leur attraction pour certains métaux lourds.

La picoalgue choisie en tant que microorganisme modèle, dont le groupe est *Ostreococcus tauri*, est une micro-algue verte isolée dans la lagune de Thau en 1994 (Courties et coll., 1994). C'est un des plus petits organismes eucaryotes connus à ce jour avec un diamètre de 1 µm, contenant une seule mitochondrie et un seul chloroplaste. Sa structure cellulaire minimaliste, sa culture facile à mettre en œuvre, le séquençage de son génome et de deux autres génomes de ce genre d'*Ostreococcus* en font un modèle émergent en biologie cellulaire et végétale. Cependant, sa découverte étant récente, de nombreux points restent à préciser, par exemple sa capacité de remodelage cellulaire en fonction des conditions extérieures. Il est probable que cette capacité ait un lien avec la composition de sa membrane plasmique, en particulier lipidique (Derelle et coll., 2006).

Effectivement, il y a une vaste quantité de données et de recherches publiées relatives à cette espèce ; en outre, le laboratoire de biogénèse membranaire (INRA, Bordeaux) possède une expertise considérable dans sa culture et son utilisation.

Elle a été conçue en tant que modèle systémique pour explorer divers mécanismes tels que le cycle cellulaire, la photosynthèse, l'horloge circadienne et l'absorption du fer (Cardol et al., 2008 ; Corellou et al., 2009 ; Monnier et al., 2010) au sein d'un organisme photosynthétique minimal spécifique à un écosystème particulier.

Cette micro-algue suscite l'intérêt des industriels en raison de sa forte teneur en nutriments tels que les polysaccharides et les acides gras polyinsaturés, indispensables pour l'alimentation

humaine et animale. Elle contient divers pigments, parmi lesquels les plus significatifs sont : la chlorophylle a et d ainsi que des phycobiliprotéines. Certaines recherches ont mis l'accent sur le rôle éventuel des systèmes biologiques dans la phyto-remédiation, en particulier celle effectuée par *O. tauri*. Cette micro-algue présente un potentiel intéressant pour la dépollution des eaux en raison de sa capacité à absorber les métaux lourds. L'étude du processus de bioaccumulation/biosorption des métaux pourrait donc offrir des perspectives intéressantes pour des applications industrielles.

La membrane plasmique n'est cependant pas le seul système membranaire présent dans cette algue. Dans le contexte de cette thèse, notre attention s'est portée sur les lipides qui composent les thylakoïdes d'*O. tauri*.

Les thylakoïdes étant des empilements de membrane présents dans les chloroplastes et impliqués dans la photosynthèse par mesures de tension de surface et AFM. Cependant, en dépit des progrès récents dans la compréhension des processus de photosynthèse, une caractérisation détaillée des lipides présents dans les membranes thylakoïdales d'*O. tauri* reste encore incomplète. Ces lipides sont pourtant déterminants pour les propriétés biophysiques de la membrane (tension de surface, organisation, stabilité).

Par conséquent, l'objectif primordial de cette étude est de décrire les caractéristiques et les propriétés biophysiques des membranes thylakoïdales de *O. tauri* à travers des approches expérimentales combinant microscopie (optique et à force atomique), méthode de Langmuir-Blodgett (LB) et modélisation de membranes synthétiques, afin d'évaluer l'impact de la composition lipidique sur la stabilité et la réactivité des membranes face aux agents métalliques potentiellement nuisibles (peroxydation lipidique).

Ce travail s'inscrit dans une démarche visant à approfondir la compréhension des propriétés membranaires de la pico-algue *O. tauri*, modèle eucaryote minimaliste dont la

simplicité structurelle en fait un organisme de choix pour l'analyse des mécanismes fondamentaux de la photosynthèse.

Pour atteindre cet objectif principal, plusieurs étapes ont été définies :

1. Caractériser la morphologie cellulaire de *Ostreococcus tauri* à l'aide de différentes techniques de microscopie optique et AFM, afin d'obtenir des informations sur la structure et l'organisation des systèmes membranaires.
2. Étudier les propriétés de surface et la dynamique des lipides membranaires par la méthode de Langmuir-Blodgett (LB), afin de déterminer les paramètres biophysiques clés (pression de surface, compressibilité, stabilité).
3. Elaborer des modèles membranaires simplifiés à partir de lipides synthétiques représentatifs des membranes thylakoïdales, pour simuler les interactions entre les membranes et les éléments métalliques.

Ce travail devrait apporter des éclaircissements sur le rôle fonctionnel des lipides dans la stabilité et la dynamique des membranes biologiques, tout en ouvrant la porte à d'éventuelles applications en bioremédiation et en biotechnologie environnementale.

I. Etat de l'art

IV. Etat de l'art

I.1. Généralités sur les microalgues

Les microalgues sont des organismes aquatiques microscopiques dotés d'une biodiversité remarquable, que l'on retrouve dans tous les environnements aquatiques, qu'ils soient marins, d'eau douce ou terrestres. Ces dernières constituent 18% du règne végétal [2], avec l'identification de 127 000 espèces d'algues. Cela les rend adaptés à une multitude de conditions environnementales. Ils sont capables de s'acclimater à toutes les conditions climatiques, des plus basses températures aux plus élevées. Ces espèces sont capables de s'installer dans tous les environnements, y compris les eaux salées, douces, saumâtres et même dans des eaux résiduaires, grâce à leur aptitude à s'adapter et à survivre. Elles ont aussi la capacité de se développer sur des surfaces dures, comme les troncs d'arbres, les structures

La vaste variété d'espèces de microalgues offre de multiples options d'application . Ce sont des organismes unicellulaires ou pluricellulaires non différenciés qui mesurent généralement au niveau du micromètre. On les désigne fréquemment sous le terme de « phytoplancton » . Grâce à la photosynthèse, les microalgues sont des convertisseurs d'énergie solaire et de l'eau particulièrement efficaces pour produire de la biomasse et de l'oxygène. Classifiés comme producteurs primaires, ces microorganismes autotrophes jouent un rôle crucial dans la libération de carbone sous forme organique et de dioxygène vers les organismes hétérotrophes situés dans les niveaux trophiques plus élevés : on leur attribuerait 45% de la production primaire nette annuelle à l'échelle mondiale . Effectivement, ces micro-organismes jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre atmosphérique en fixant le dioxyde de carbone et en libérant de l'oxygène, ce qui favorise la pérennité de la vie animale et végétale.

À une échelle microscopique, elles peuvent apparaître soit individuellement, soit en regroupements et prendre diverses formes : fréquemment sphériques (Porphyridium), de petites gouttelettes (Chlamydomonas), filamenteuses (Spirulina), spiralées (Arthrospira) et même

IV. Etat de l'art

étoilées (Staurostrum) . En fonction de leur nature, des conditions environnementales et par le biais de la photosynthèse, les microalgues sont capables de générer d'importantes quantités de lipides, de glucides et de protéines.

I.2. Critères de classification des algues

La phylogénie des algues est influencée par divers facteurs écologiques, physiologiques et biochimiques tels que les structures cellulaires, la méthode de nutrition, l'environnement, ainsi que la nature et l'emplacement des pigments et des glucanes de réserve. Bien qu'elles soient d'une diversité remarquable, les algues peuvent être catégorisées en environ dix embranchements sur la base de critères liés à leurs pigments, leurs réserves de polysaccharides et certaines caractéristiques structurales telles que le nombre de membranes plastidiales, l'agencement des thylacoïdes, la configuration des crêtes mitochondriales et la nature de leur système flagellaire.

I.3. Diversité et classification

Les micro-algues forment un ensemble particulièrement varié qui partage une cohérence physiologique : la photosynthèse oxygénique . Selon les estimations, cette famille pourrait comprendre de plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces, dont 47000 sont déjà décrites. Pour mettre en perspective, on estime qu'il y a environ 400 000 espèces de plantes supérieures. Le classement de cette diversité (Tableau 1.1) est compliqué et la taxonomie est souvent modifiée, en particulier à cause de l'emploi des méthodes de phylogénie moléculaire.

I.4. Description des différentes classes d'algues

En fonction de divers critères de classification, on dénombre onze catégories d'algues, dont une est procaryote (les cyanobactéries) et dix sont eucaryotes. Le tableau présente la composition en pigments et en glucanes de réserve, le nombre de membranes plastidiales,

IV. Etat de l'art

ainsi que le compte et l'agencement des thylakoïdes pour les différents groupes d'algues. Dès le début du XIXe siècle, les pigments ont été un élément essentiel dans la catégorisation des algues. Ces molécules ont pour fonction physiologique d'absorber l'énergie lumineuse. En fonction des pigments additionnels liés à la chlorophylle a, les chloroplastes peuvent être de couleur verte (chlorobiontes), brune (Ochromyces), bleue (Cyanophyta) ou rouge (Rhodophyta).

I.4.1. Procaryotes photosynthétiques

I.4.1.1. Embranchement des Cyanophyta (lignée bleue)

Les algues procaryotes constituent un groupe d'eubactéries photosynthétiques, comprenant les cyanobactéries ainsi que les prochlorophytes. Les cyanobactéries, qui font partie du règne des eubactéries, en sont principalement les illustrations. La cellule présente plusieurs structures communes, parmi lesquelles figure la capsule mucilagineuse. En ce qui concerne la structure et la composition, leur paroi partage des ressemblances avec celle des bactéries Gram-négatif. L'organelle ne se trouve pas dans la cellule. Les thylacoïdes sont dispersés dans le cytoplasme [25]. Les cyanobactéries renferment de la chlorophylle a et disposent des photosystèmes I et II. Elles abritent des phycobilisomes qui contiennent du PE, du PC et de l'APC.

I.4.2. Eucaryotes photosynthétiques

I.4.2.1. Phylum des Glaucophyta

Il y a trois genres et quatorze espèces dans cet embranchement. Les glaucophytes constituent un groupe restreint d'algues unicellulaires, autotrophes et indépendantes, qui peuvent parfois former des colonies. Elles font partie de la même lignée que les algues vertes et rouges. Les thylakoïdes contiennent des phycobilisomes qui sont composés de PC et d'APC. On trouve aussi de la chlorophylle a.

IV. Etat de l'art

I.4.2.2. Embranchement des Rhodophyta

Ce groupe comporte plus de 70 genres et plus de 4 000 espèces recensées. Les algues rouges forment un groupe distinct et unifié. Il est peu fréquent qu'elles soient unicellulaires. Les algues rouges renferment de la chlorophylle a, ainsi que des pigments supplémentaires : PE, PC et APC, qui sont disposés au sein du phycobilisome.

On retrouve du β -carotène, de l' ϵ -carotène ainsi que du β,β -carotène. La lutéine et la zéaxanthine sont les principales xanthophylles. La portion fibrillaire de la paroi cellulaire est constituée de cellulose ou de xylanes, tandis que la portion mucilagineuse est composée de galactanes sulfatés ou de mannanes.

. I.4.2.3. Sous-règne de Chlorobionta (lignée verte)

Les algues vertes comprennent une classification qui compte de 550 à 570 genres et entre 16 000 et 17 000 espèces. On trouve la chlorophylle a et b au sein du chloroplaste. Bien que les algues vertes soient généralement microscopiques et dulçaquicoles, elles peuvent être trouvées dans différents milieux. Leur chloroplaste contient de la chlorophylle a et b [21]. Les Chlorobionta comprennent deux infra-règnes distincts : les Chlorophyta et les Streptophyta.

I.4.2.4. Classe des Euglénophyceae (lignée verte)

On estime qu'il existe entre 40 et 50 genres et de 650 à 1 050 espèces qui appartiennent à la classe des Euglénophyceae. Ces algues, dotées de flagelles et unicellulaires, se trouvent rarement en colonies. Beaucoup d'euglénophycées ne présentent aucune pigmentation, certaines ont perdu leurs chloroplastes au fil de l'évolution. Lorsque les chloroplastes sont présents dans les euglènes, ils contiennent des chlorophylles a et b, similaires à celles que l'on trouve dans les algues vertes dont elles dérivent. Les euglènes contiennent du β,β -carotène et divers caroténoïdes, dont la néoxanthine et la diadinoxanthine sont les plus remarquables.

IV. Etat de l'art

1.4.2.5. Embranchement des Dinophyta (lignée brune)

On dénombre approximativement 4 000 espèces réparties dans 550 genres au sein de ce groupe. Ces algues ne sont pas directement liées aux autres types d'algues, mais elles sont associées aux Sporozoa et aux ciliés. La plupart des dinophytes sont unicellulaires. On trouve certaines formes filamenteuses qui sont assez rares. Elles se distinguent par un type de mitose spécifique qui implique la présence d'un fuseau externe. La plupart de ces organismes possèdent un dynocarion. Plusieurs formes de chloroplastes sont présentes chez les espèces qui effectuent la photosynthèse. Divers eucaryotes endosymbiotiques sont présents chez les dinophytes. Les chloroplastes contiennent de la chlorophylle a et c, à l'instar des haptophytes, ochrophytes et cryptophytes. Le chloroplaste typique à péricidine contient de la chlorophylle a, c2, à l'instar de ce qu'on observe chez les cryptophytes. La plupart des pigments additionnels sont le β,β -carotène et la péricidine.

1.4.2.6. Embranchement des Haptophyta (lignée brune)

Il s'agit d'algues possédant des chloroplastes teintés de doré-brun par la présence de caroténoïdes. Elles constituent une lignée distincte caractérisée par un organe spécifique : l'haptophème. Il y a à peu près 80 genres et 300 espèces dans cet embranchement. Les haptophytes sont des êtres unicellulaires de type monadoïde. Il s'agit principalement d'organismes marins et planctoniques. On a trouvé de la chlorophylle a et c parmi les pigments retrouvés.

IV. Etat de l'art

I.5. Croissance des microalgues

Les microalgues constituent des organismes microscopiques. À l'instar de tous les microorganismes, la croissance des microalgues se divise en quatre phases. Cette courbe représente typiquement la croissance des microalgues dans un environnement non renouvelé, c'est-à-dire en milieu naturel ou lors d'une culture par lots.

I.5.1. Phase de latence

La période de latence fait référence à la phase durant laquelle le microorganisme s'acclimate à son environnement, et la rapidité de croissance pendant ce laps de temps est pratiquement inexistante.

I.5.2 .Phase exponentielle

Il s'agit de l'étape où le taux de croissance est stable et atteint son niveau maximal. La reproduction des microorganismes se produit et leur taux de mortalité est bas. Durant cette étape, le potentiel du milieu atteint son apogée, l'expansion est inexistante, le taux de multiplication et le taux de décès sont comparables.

I.5.3 Phase de déclin

Phase où les microorganismes périssent et cessent de se multiplier. Les microalgues sont des êtres vivants photoautotrophes, ce qui signifie qu'elles tirent leur énergie de la lumière et leur source de carbone provient d'un carbone inorganique tel que le dioxyde de carbone.

Toutefois, certaines microalgues ont la capacité de croître en absence de lumière, on les qualifie alors d'hétérotrophes. Ils peuvent puiser leur source de carbone dans divers composés organiques tels que le glucose (Cadoret et al., 2008). Il est possible pour certaines algues de croître en employant une combinaison des deux modes, ce qui fait d'elles des organismes mixotrophes. Selon Suali et al. (2012), les microalgues produisent 20 fois plus d'huiles que les

IV. Etat de l'art

cultures oléagineuses terrestres. Du fait de leur rendement photosynthétique élevé, les microalgues absorbent plus de dioxyde de carbone que les végétaux terrestres (Park et al., 2011 ; Langley et al., 2012).

I.6. Reproduction des microalgues

Tous les êtres vivants traversent différentes étapes de vie, qui peuvent varier en fonction, avant de retrouver leur condition originelle. On appelle ce processus cycle de vie, du fait de son aspect cyclique ou récurrent.

I.6.1. Reproduction asexuée

La multiplication des micro-algues se fait majoritairement par reproduction asexuée ou multiplication végétative : une cellule mère peut se scinder en deux cellules filles ayant le même patrimoine génétique. Cette forme de reproduction peut être classée en trois catégories (Philippart et al., 2009).

I.6.2. Reproduction sexuée

Ce mode est le moins courant et le plus imprévisible, généralement activé par des circonstances environnementales spécifiques souvent caractérisées par de multiples facteurs. Au cours de ce processus de reproduction, les gamètes mâles et femelles fusionnent pour créer un zygote diploïde (Vanormelingen *et al.*, 2010). Ces gamètes, résultant de la modification du contenu d'une cellule fécondée, l'œuf ou le zygote formé, vont se développer pour donner naissance à un nouvel individu présentant une différence génétique par rapport aux parents. Ce sporophyte diploïde, aussi désigné sous le terme d'organisme diploïde, produira des sporocystes

IV. Etat de l'art

via la méiose, un processus qui diminue le nombre de chromosomes de moitié (Asma *et al.*, 2010).

I.7. Culture des microalgues

I.7.1. Milieu de culture

Dans leur habitat naturel, les microalgues tirent tous les nutriments, minéraux et vitamines nécessaires de l'eau dans laquelle elles résident. Toutefois, pour les cultiver en laboratoire, il est nécessaire de leur assurer l'accès à ces ressources fondamentales, ce qui implique la création d'environnements propices à leur croissance. Le terme « milieux de culture des microalgues » désigne la solution ou le milieu dans lequel les microalgues se reproduisent. Tous les environnements partagent plusieurs éléments communs : les origines de l'azote (présent dans les nitrates, nitrites et ammoniac), le phosphore, les vitamines et les microéléments (Petkov *et al.*, 2012). Néanmoins, les chercheurs citent souvent dans la littérature BBM (Bischoff 1963) et Allen (Allen 1959), qui sont parmi les milieux de culture synthétiques les plus courants

I.7.2. Les conditions de culture

Les microalgues peuvent se développer dans différentes conditions selon les sources d'énergie et de carbone utilisés.

- a. **Culture photoautotrophie :** L'élevage de micro algues photoautotrophes se réalise sous une lumière visible et en présence de carbone inorganique dans le

IV. Etat de l'art

milieu de culture, qui fait alors office de source exclusive de carbone (Razzak et al., 2017).

b. Culture hétérotrophe : Dans une culture hétérotrophe, les microalgues utilisent des composés organiques à base de carbone comme unique source de carbone et également comme source d'énergie. Par conséquent, du fait que la lumière n'est plus essentielle à la croissance cellulaire (Huang et al. 2010), cette culture se révèle être la moins onéreuse. Dans un cadre hétérotrophe, la création et l'élargissement du réacteur destiné au traitement des eaux sont sensiblement moins compliqués (Perez-Garcia et al. 2011).

c. Culture mixotrophique : Dans un environnement mixotrophe, ces organismes peuvent croître de manière autotrophe ou hétérotrophe, en fonction de la quantité de lumière et du niveau de concentration en carbone disponible (Martins *et al.* 2018).

I.7.3. Système de culture

L'évaluation des métabolites de microalgues exige leur production à grande échelle ou production industrielle. En fonction de leur application, la culture intensive de microalgues est perçue comme une méthode pour la fabrication à grande échelle de biocarburants.

a. Systèmes ouverts

Dans les systèmes ouverts, une grande partie de la culture est soumise à l'environnement externe. La culture s'effectue dans des bassins artificiels. L'agitation et le transport du milieu sont effectués à l'aide d'hélices ou d'injecteurs d'air : Le contrôle du flux est assuré par la vitesse de rotation de cette roue, tandis qu'un système de bullage garantit l'injection de CO₂. Typiquement, ces bassins présentent une profondeur limitée (Dianursanti et al., 2016). Il est plus facile et moins cher de mettre en place et d'utiliser des systèmes ouverts par rapport aux réacteurs fermés.

IV. Etat de l'art

Cependant, ces systèmes sont exposés à des restrictions dues à leur contact direct avec l'environnement, risquant ainsi d'être contaminés par diverses espèces de microalgues, et également par des bactéries, virus ou invertébrés (Narala et al., 2016).

b. Systèmes fermés

Ces systèmes ont été élaborés dans le but de remédier aux problèmes inhérents aux systèmes antérieurs. Ils minimisent les dangers de contamination et offrent un meilleur contrôle sur les conditions de culture. Toutefois, la formation d'un biofilm de microalgues sur les photobioréacteurs est une problématique significative susceptible de provoquer une surcharge en oxygène dans la culture, ce qui pourrait engendrer des conséquences toxiques pour la photosynthèse.

c. Systèmes hybrides

Les systèmes de culture de microalgues peuvent être combinés afin d'optimiser le processus de production ; par conséquent, la majorité des bio-usines de microalgues travaillent avec des systèmes dits hybrides (Schenk et al., 2008). Ces systèmes unissent essentiellement diverses formes de cultures, optimisant ainsi la qualité globale du produit, tout en fusionnant deux phases de croissance (Louw et al., 2016). La première phase de la culture se passe dans un photobioréacteur où les conditions sont régulées afin de réduire au minimum la contamination par les microorganismes. La seconde phase implique la culture de l'organisme dans un bassin ouvert, où les cellules sont soumises à un certain stress nutritionnel pour stimuler la production d'un métabolite particulier (lipide, protéine ou glucide) (Park et al., 2013).

*Les facteurs qui affectent la croissance des microalgues : La croissance des microalgues peut être influencée par divers éléments biotiques et abiotiques (Yadav et al., 2017). Les facteurs biotiques englobent l'existence de pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus,

IV. Etat de l'art

en plus de la rivalité avec d'autres microalgues. Les facteurs abiotiques englobent l'intensité de la lumière (en termes de qualité et volume), la température, le pH, la salinité, le CO₂ en solution et l'existence de composés nocifs (Gonçalves et al., 2017).

1.8. Phylogénie des microalgues eucaryotes du phytoplancton

L'expression microalgue désigne une grande variété d'organismes unicellulaires eucaryotes, généralement photosynthétiques (ou l'ayant été), et principalement aquatiques, bien que certaines espèces de microalgues vertes soient fréquemment rencontrées dans les écosystèmes terrestres (Holzinger et Karsten, 2013). Le phytoplancton désigne les organismes unicellulaires photosynthétiques, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, présents dans les écosystèmes aquatiques.

La diversité exceptionnelle des microalgues s'explique par leur présence au sein de cinq des six supergroupes (règnes) eucaryotes, avec Archeplastida et Chromalveolata étant les plus prévalents. Le groupe Chromalveolata est uniquement constitué de microalgues et de macroalgues. Ce groupe est le plus diversifié sur le plan évolutif, comprenant les diatomées (Stramenopiles), les Eustigmatophytes, les dinoflagellés (Alveolata) ainsi que les Haptophytes (Burki et al., 2016). Les super-groupes Rhizaria et Excavata sont moins connus (Archibald, 2005 ; Khozin Goldberg et al., 2016 ; Nakayama et Archibald, 2012).

L'origine évolutive des plastes est subtilement mise en évidence par la phylogénie des microalgues. Le développement des divers groupes de microalgues est basé sur des processus d'endosymbiose primaires, secondaires et même tertiaires impliquant des organismes photosynthétiques effectués par des protistes ancestraux.

L'événement de l'endosymbiose primaire, survenu il y a 1,8 milliard d'années, qui représente la capture d'une cyanobactérie par un ancêtre eucaryote, est un phénomène

IV. Etat de l'art

exceptionnel. Par conséquent, la cellule qui en découle possède un plastide photosynthétique encapsulé par deux membranes, équipé d'un génome minimisé dérivé des cyanobactéries (Gould et al., 2008 ; Kutschera et Niklas, 2005). Cette endosymbiose a permis l'évolution des organismes appartenant au règne Archeplastidia, qui comprend les microalgues des embranchements Glaucophyta, Rhodophyta (ou algues rouges) et Chlorophyta (ou algues vertes), ainsi que les plantes terrestres (Streptophyta) (Fig. 6). (McFadden et Van Dooren, 2004 ; Rodríguez- Ezpeleta et al., 2005 ; Simon et al., 2009).

Des preuves de nature ultra-structurale, biochimique et génétique ont continuellement confirmé l'existence d'endosymbioses supplémentaires impliquant des microalgues vertes ou rouges. D'après ces recherches, l'apparition des euglènes (super-groupe Excavata), des chlorarachniophytes (super-groupe Rhizaria) et d'un petit groupe de dinoflagellés est attribuée à l'endosymbiose secondaire d'une algue verte (voir Fig. 6). Pendant ce temps, l'émergence du super-groupe Chromalveolates serait le résultat d'une endosymbiose secondaire ou même tertiaire d'une microalgue rouge par un ancêtre eucaryote (Delwiche et Palmer, 1996 ; Kutschera et Niklas, 2005, 2008).

Ces endosymbioses secondaires entraînent la formation de plastides qui sont entourés de 3 ou 4 membranes. On observe des preuves d'endosymbiose secondaire cachée de microalgue verte chez les diatomées. Effectivement, des gènes nommés « verts » ont été récemment identifiés dans le génome de diatomées et semblent avoir un lien évolutif avec les ancêtres des prasinophytes (Moustafa et al., 2009).

Les prasinophytes désignent un groupe paraphylétique, ce qui signifie qu'il ne regroupe qu'une fraction des descendants d'un ancêtre commun. La plupart des espèces picoeucaryotes recensées appartiennent aux prasinophytes (organismes de moins de 2 ou 3 μm de diamètre). Selon Leliaert et al. (2012), ce groupe s'est scindé en raison de la disparité entre les Chlorophytes

IV. Etat de l'art

et les Streptophytes au sein de la lignée verte. Les prasinophytes ont initialement été décrits comme des organismes couverts d'écailles, possédant entre un et huit 24 flagelles (Mattox et Stewart, 1984). La phylogénie des prasinophytes a subi récemment une réévaluation et est constamment en évolution (Marin et Melkonian, 2010).

1.9. La membrane cellulaire

1.9.1. Rappels historiques et évolution du modèle de membrane

Au XVIII^e siècle, Robert Hook et Théodor Schwann ont proposé l'idée que la cellule constitue l'élément essentiel de la vie. Donc, la cellule, dérivée du latin « cellula » qui signifie « petite chambre », est l'unité structurelle, fonctionnelle et de reproduction de tous les organismes vivants. La cellule est délimitée par une barrière physique nommée membrane plasmique, qui l'isole de son environnement. Grâce à sa composition et sa structure, par exemple, la membrane est capable de conserver les différences de concentration entre le cytoplasme et l'environnement extérieur.

Elle participe aussi à des processus cellulaires essentiels pour le fonctionnement optimal de la cellule, tels que : les interactions avec l'environnement, l'adhésion et la reconnaissance entre cellules, la transduction de signaux, le transport à travers la membrane, etc. S. J. Singer et G. L. Nicolson ont introduit le concept de « mosaïque fluide » en 1972 afin d'expliquer la structure des membranes.

Singer et Nicolson avancent également que les lipides et les protéines sont distribués de façon asymétrique entre les deux couches de la membrane, et qu'ils se déplacent transversalement et latéralement (le phénomène du « flip-flop » pour les lipides et le mouvement

IV. Etat de l'art

latéral pour les protéines tout comme pour les lipides), d'où leur appellation de « mosaïque fluide ».

Par ailleurs, Singer et Nicolson distinguent deux catégories de protéines : les protéines extrinsèques ou périphériques et les protéines intrinsèques ou intra-membranaires. Selon leur emplacement et leur profondeur au sein de la membrane, ces protéines effectuent différentes tâches, la plus cruciale étant celle qui facilite l'échange entre l'environnement extracellulaire et le cytoplasme. Durant les années 1990, l'approche structurée de la membrane cellulaire se solidifie tout en conservant une base ancrée dans le principe de mosaïque fluide. Des biologistes et des biophysiciens proposent l'idée de la présence d'hétérogénéités latérales et de micro-domaines, spécifiquement dans le feuillet externe de la membrane, désignés sous le nom de « rafts ».

D'après cette hypothèse, la diversité des espèces lipidiques présentes dans les membranes, avec leurs diverses propriétés physico-chimiques, serait responsable d'une séparation de phase des lipides selon les conditions physiologiques (température, pH, pression osmotique...) et également du recrutement local de protéines membranaires spécifiques par les domaines lipidiques ainsi créés. Dans ce contexte et après avoir effectué des analyses à l'aide de différentes techniques biophysiques, l'idée des radeaux lipidiques ou rafts a finalement été proposée dans les années 1990.

Ce modèle suppose donc la présence de micro-domaines riches en différents lipides, sphingolipides, glycolipides et cholestérol, ainsi que dans certaines protéines. On admet maintenant que cette ségrégation des phases a une importance dans plusieurs processus : la signalisation, l'apoptose, la fusion membranaire, l'adhésion et le mouvement cellulaire...

IV. Etat de l'art

1.9.2. Composition moléculaire

La membrane se compose principalement de lipides et de protéines, tandis que les glucides sont présents en quantités moindres. Ces éléments sont présentés sur la surface externe de la membrane et restent continuellement attachés par covalence à des lipides ou des protéines, formant ainsi des glycolipides et des glycoprotéines. En moyenne, les membranes sont constituées de 40% de lipides, 52% de protéines et 8% de glucides (% en poids sec de la membrane). Compte tenu de la différence de poids moléculaire entre ces deux types de molécules, on estime qu'il existe approximativement 50 molécules lipidiques pour chaque molécule protéique.

En se basant sur leur arrangement et leur emplacement, les protéines de la membrane cellulaire sont classées en deux types : les protéines périphériques et les protéines transmembranaires. Les protéines de surface, qui ne traversent pas significativement la bicouche lipidique, sont attachées à la membrane sur son côté extérieur par le biais d'interactions ioniques et/ou de liaisons hydrogène. Si elles sont situées sur la face interne de la membrane, elles participent, par exemple, à la fonction de support cellulaire (en lien avec le cytosquelette).

Du fait de leur emplacement, ces protéines participent aussi à des réactions qui ont lieu à la limite entre la membrane et les compartiments aqueux, externes ou internes, pouvant constituer une étape d'un processus plus large. Les protéines intrinsèques, pour leur part, sont totalement intégrées ou traversent la bicouche lipidique, ce qui facilite la communication entre la cellule et son environnement externe. Elles peuvent jouer le rôle de canal ou de transporteur actif ou passif de molécules à travers la membrane (comme les aquaporines, les pompes ioniques K^+ ...), agir en tant que récepteur et transducteur de signaux (tels que les hormones, les neurotransmetteurs,...), ou encore servir comme catalyseurs enzymatiques (par exemple,

IV. Etat de l'art

NADPH oxydase, cytochrome oxydase...). Ces protéines peuvent aussi être impliquées dans les processus de reconnaissance entre cellules et dans l'adhésion des membranes de deux cellules.

1.9.3. Les lipides membranaires

Les lipides sont des molécules amphiphiles (ou amphipathiques) qui possèdent une tête polaire (hydrophile) et, en règle générale, deux chaînes hydrocarbonées (hydrophobes).

Au sein de la membrane, ces lipides se disposent en une bicouche dont la fluidité peut varier, avec une épaisseur oscillant entre 6 et 7 nm. Les segments ou parties hydrophobes sont orientés vers le cœur de la bicouche tandis que les têtes hydrophiles interagissent avec le cytoplasme ainsi que l'environnement extracellulaire, qui est riche en eau. En considérant les protéines et les glucides, l'épaisseur moyenne de la membrane se situe entre 8 et 11 nm. Les principales catégories de lipides membranaires comprennent : les glycérophospholipides, généralement appelés phospholipides, les sphingolipides, les glycolipides et les stérols.

I.10. Les glycérophospholipides ou phospholipides

On crée un phospholipide en liant deux acides gras à deux groupes hydroxyle d'une molécule de glycérol. Un groupe phosphate se fixe à un composé hydrophile et se rattache à la troisième fonction alcool du glycérol afin de constituer la tête polaire. Selon la composition de cette substance, on observe fréquemment la présence de phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS) ou phosphatidylinositol (PI). De ce fait, en fonction de la composition du groupe sur le composé hydrophile, la tête peut présenter une charge négative (PS, PE) ou être zwitterionique avec deux charges contraires (PC).

I.11. Les sphingolipides

Il s'agit de lipo-polysaccharides qui se trouvent uniquement sur le feuillet externe et qui jouent un rôle dans la reconnaissance et l'adhésion des cellules. Les glycolipides sont constitués

IV. Etat de l'art

d'un ou plusieurs sucres (oligosaccharides), qui forment la portion polaire, et de deux chaînes carbonées qui favorisent leur intégration dans la bicouche lipidique. La portion polaire est abondante en groupes –OH qui participent à des liaisons hydrogène avec l'eau (ce qui justifie leur hydratation importante) ou d'autres glycolipides.

I.12. Les galactolipides

La composition lipidique des membranes chloroplastiques, particulièrement bien préservée depuis les cyanobactéries jusqu'aux plantes, présente une spécificité remarquable. Ces dernières se caractérisent par une présence notable de galactolipides neutres, tels que le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG), qui sont des glycérolipides. D'après Block et al. (1983), ils constituent aux alentours de 80 % des lipides totaux, correspondant respectivement à 53% et 27% des lipides membranaires présents dans les thylakoïdes des chloroplastes (voir le Tableau 1 qui s'appuie sur la revue de Kobayashi, 2016). D'autres lipides, moins fréquents, comprennent des glycérolipides anioniques comme le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et le phosphatidylglycérol (PG), ce dernier étant aussi considéré comme un phospholipide.

Tableau 1 : Composition lipidique de la membrane des chloroplastes végétaux. MGDG : monogalactosyldiacylglycérol, DGDG : digalactosyldiacylglycérol, SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol, PG : phosphatidylglycérol. Tiré de la revue de (Kobayashi, 2016).

		MGDG	DGDG	SQDG	PG	Others
Chloroplast	Thylakoids ^a	53	27	7	7	6
	Inner envelope ^b	49	30	5	8	8
	Outer envelope	17	29	6	10	38

^a Isolated from spinach leaves (wt%) (Dorne et al. 1990)

^b Isolated from spinach leaves (wt%) (Block et al.1983)

IV. Etat de l'art

1.12.1. Structure

Les galactolipides se composent d'un glycérol, de deux acides gras (AG) estérifiés aux positions sn-1 et sn-2 du glycérol. En ce qui concerne le MGDG, il contient un galactose en sn-3 du glycérol, tandis que le DGDG comprend deux galactoses (Figure 2). Dans le règne végétal, il est courant de trouver des acides gras ayant une chaîne de 16 ou 18 atomes de carbone (C16 ou C18), qui varient d'espèces totalement saturées à des espèces insaturées comportant jusqu'à trois doubles liaisons (0 à 3 insaturations du C16:0 au C16:3 et du C18:0 au C18:3).

On peut distinguer deux types de galactolipides selon les acides gras localisés aux positions sn-1 et sn-2. Le premier est identifiable par la présence d'un acide gras en C16 à la position sn-2 ; on le désigne comme « procaryote » par MGDG DGDG. Fluidité et diffusion membranaires

La membrane cellulaire opérationnelle est fluide, permettant aux molécules (lipides et protéines) de se diffuser plus ou moins aisément à travers le plan de la membrane [15]. Cette perméabilité membranaire joue un rôle clé dans diverses fonctions cellulaires en facilitant l'agrégation locale de molécules spécifiques. De nombreuses publications ont été consacrées à l'analyse de la dynamique des membranes à travers diverses méthodes de caractérisation. On peut mentionner, entre autres, la technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence) parmi ces méthodes.

Cette méthode utilise une sonde fluorescente pour marquer le système lipidique. Donc, l'échantillon montre une région non fluorescente encadrée par une région fluorescente. Les molécules fluorescentes non endommagées rétablissent progressivement la zone sombre en se dispersant dans le plan de l'échantillon. L'examen du déplacement de la sonde fluorescente permet d'estimer le coefficient de diffusion latéral D , lié à la vitesse de déplacement des

IV. Etat de l'art

molécules dans leur milieu, et donc à la fluidité des lipides. L'étude de la diffusion latérale peut également être réalisée grâce à une autre méthode intéressante : la résonance magnétique nucléaire (RMN) à gradient de champs pulsé.

On peut également évaluer la fluidité des membranes en utilisant la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) [36-38]. Cette technique repose sur l'étude des variations d'intensité de fluorescence dans un volume d'observation restreint au fil du temps, ces variations étant associées aux déplacements de la sonde fluorescente qui entre et sort. Comme indiqué précédemment, la fluidité du système lipidique dépend en grande partie de la structure des lipides, qui favorise ou non leur arrangement régulier. Pour une membrane, la situation devient beaucoup plus compliquée en raison de la multitude de lipides distincts et leur distribution non uniforme. Le cholestérol est un modérateur de la fluidité membranaire, empêchant sa 'solidification' à des températures basses ou une possible augmentation excessive de sa fluidité à des températures plus élevées. Il participe aussi à l'éducation des rafts par le biais de ses interrelations privilégiées avec les sphingolipides.

En effet, la phase des rafts se positionne entre une phase fluide et une phase condensée. Cette phase dite « ordre-liquide » se caractérise par un arrangement serré et structuré des molécules, semblable à celui de la phase de gel. Néanmoins, ces molécules conservent une mobilité significative qui facilite notamment l'incorporation du cholestérol au sein des filaments de phospholipides.

Par ailleurs, des recherches ont démontré que les deux couches de la membrane ne possèdent pas la même composition en lipides et protéines [39,40], indiquant que la fluidité y est intrinsèquement distincte. Finalement, le feuillet interne établit une interaction forte avec le cytosquelette, ce qui restreint la diffusion de certaines protéines.

IV. Etat de l'art

1.12.1. Applications et marchés potentiels des micro-algues

Selon Spolaore et al. (2006), l'utilisation des micro-algues remonterait à 2000 ans en Chine, où Nostoc, une Cyanobactérie, était employé comme aliment pour subsister lors de périodes de famine. Dans le cadre d'une crise alimentaire persistante, en 1940, les scientifiques ont tourné leur attention vers les micro-algues comme source de nourriture en raison de leur richesse en protéines.

En France, le secteur démarre à la fin des années 1970 avec l'établissement des premières fermes de mollusques et la production de micro-algues destinées à l'aquaculture. Selon les estimations, en 2005, la production mondiale de toutes espèces réunies s'élevait à 7000 tonnes de matière sèche par an. Actuellement, avec seulement une poignée d'espèces cultivées, la production mondiale ne dépasse pas les 10 000 tonnes (Julie Person et al., 2011). À l'heure actuelle, l'utilisation commerciale des micro-algues connaît une croissance rapide. La variété des espèces et l'abondance de métabolites ouvrent la voie à une multitude d'applications touchant ainsi plusieurs domaines industriels.

1.12.2. Applications environnementales (traitement des eaux usées)

Les micro-algues ont la faculté d'absorber une multitude de nutriments indispensables à leur croissance, elles sont donc en mesure de supprimer certains éléments présents dans les eaux usées. Par conséquent, elles aident à diminuer les taux de phosphates et de nitrates. Elles ont des capacités de purification et de désintoxication et peuvent agir via deux processus : soit en liant directement les métaux lourds, soit en fournissant oxygène dissous aux bactéries, favorisant ainsi le nettoyage des eaux contaminées. Des recherches antérieures ont examiné l'élimination des métaux lourds présents dans les eaux usées (Perales-Vela et al., 2006), ainsi que la dégradation de polluants nocifs comme le tributylétain « TBT » par *Chlorella vulgaris* (Luan et al., 2006).

IV. Etat de l'art

Des recherches précédentes ont examiné l'extraction des métaux lourds présents dans les eaux usées (Perales-Vela et al., 2006) tout comme la dégradation de polluants nocifs tels que le tributylétain « TBT » par *Chlorella vulgaris*. L'un des atouts majeurs de la culture des micro-algues est leur capacité à capter le CO₂ par le biais de la photosynthèse, qui est par la suite transformé en biomasse, lipides ou bioproduits de valeur. Le dioxyde de carbone produit par les centrales thermiques, les industries sidérurgiques, cimentières, pétrolières et d'autres secteurs peut donc être exploité pour l'élevage industriel de micro-algues.

I.13. Production de molécules à haute valeur ajoutée

Dans cette situation, la micro-algue est cultivée spécifiquement pour un composant particulier de sa composition. Ces molécules comprennent : les pigments, les acides gras polyinsaturés, les polysaccharides et les substances bioactives.

I.13.1. Les pigments

L'une des pistes de valorisation prometteuses issues des micro-algues est la production de pigments. Ces pigments peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire comme colorants, ou encore dans le secteur pharmaceutique comme pigments fluorescents. Une vaste gamme de pigments, dédiés à diverses applications, se trouve au sein des micro-algues.

I.13.2. Les caroténoïdes

Chez les microalgues, la famille des caroténoïdes est la plus abondante en termes de pigments. De nombreux organismes vivants doivent leur couleur rouge-jaune-orange à ces pigments. Les caroténoïdes ont une importance capitale pour la nutrition et la santé, étant donné que plusieurs d'entre eux agissent comme des précurseurs de la vitamine A, également appelés provitamines A. Les caroténoïdes possèdent également des vertus antioxydantes, ce qui est bénéfique pour la peau, le système immunitaire, le système cardio-vasculaire et dans la bataille contre le cancer. De nombreux pigments utilisés dans le secteur industriel se trouvent

IV. Etat de l'art

dans les microalgues, tels que : le β -carotène, l'astaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine, et ainsi de suite...

I.13.3. Lipides et Acides gras polyinsaturés

Les micro-algues présentent un atout par rapport aux espèces oléagineuses terrestres : elles ont la capacité d'accumuler jusqu'à 80% de leur masse sèche en acides gras, ce qui laisse envisager des rendements à l'hectare plus élevés que pour les espèces terrestres oléagineuses. Parmi les différents acides gras qui composent leur structure, certains présentent un intérêt particulier : l'acide γ -linolénique GLA (18 :3, cis 6, 9, 12), l'acide arachidonique AA (20 :4 cis 5, 8, 11, 14), l'acide eicosapentaénoïque EPA (20 :5 cis 5, 8, 11 14, 17) et l'acide docosahexaénoïque DHA (22 :6 cis 4, 7, 10, 13, 16,19) (Certik et Shimizu,1999). On qualifie ces acides gras d'essentiels car notre corps ne peut pas les produire de lui-même.

Notre alimentation nous fournit ces éléments. Ils ont un impact spécifique sur la composition des membranes cellulaires et sur l'équilibre des réactions physiologiques dans le corps. Le DHA est essentiel pour un fonctionnement optimal du cœur et du cerveau. À l'heure actuelle, ces acides gras essentiels sont principalement fabriqués à partir des huiles de poisson.

Étant donné la diminution des ressources halieutiques, l'obtention d'acides gras essentiels à partir d'une autre source pourrait représenter une solution intéressante. De plus, ces composés dérivés des micro-algues offrent une saveur plus plaisante, une digestibilité accrue et un moindre parfum. Certaines variétés de micro-algues, telles que le *Nannochloropsis*, le *Phaeodactylum tricornutum*, le *Porphyridium*, le *Nitzschia laevis*, le *Mortierella*, le *Pythium* et le *Parietochloris incisa*, affichent une concentration élevée d'EPA dans leurs huiles variant entre 7 et 50% (Certik et Shimizu, 1999; Khozin-Goldberg et al., 2006).

IV. Etat de l'art

Les micro-algues représentent également une opportunité de valorisation attrayante grâce aux phospholipides. On les retrouve dans toutes les cellules, et ils contribuent à une variété de fonctions cellulaires. Il s'agit de vecteurs d'acides gras ou de principes actifs en raison de leur double polarité (hydrophobe et hydrophile). Ils sont également employés comme bio-surfactant ou émulsifiant dans l'industrie agroalimentaire.

I.13.4. Polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères qui se dissolvent dans l'eau et possèdent des caractéristiques rhéologiques intéressantes, particulièrement bénéfiques dans le secteur de l'alimentation pour la gélification de certains liquides, ainsi que dans le domaine cosmétique pour l'épaississement de certaines crèmes. Des espèces de micro-algues telles que *Porphyridium purpureum* et *Arthrospira platensis* produisent des exopolysaccharides hydrophiles et polyanioniques (Becker, 2004) qui ont la capacité de retenir l'eau et d'absorber les cations, ce qui empêche la déshydratation cellulaire. Ces caractéristiques de concentration ont proposé des utilisations biotechnologiques dans le secteur environnemental grâce à la décontamination des environnements pollués par les métaux lourds (Pb, As, Hg, Cd.) ou dans le domaine de la récupération biologique de métaux tels que l'or et l'uranium.

I.13.5. Substances bioactives

On a découvert de nombreuses substances présentant une activité biologique intéressante dans le milieu marin. Certaines micro-algues ont montré une activité antibiotique lors de tests effectués in vitro. Dans les Cyanobactéries, une activité antivirale a été observée, en particulier dans un produit extracellulaire dérivé d'*Arthrospira platensis* qui combat le VIH-1, le virus de l'herpès simplex 1 et le virus humain herpétique type 6 (Ayehunie et al., 1998 ; Hernández-Corona et al., 2002). Des tests en laboratoire réalisés sur *Porphyridium purpureum* indiquent que

IV. Etat de l'art

les exopolysaccharides (EPS) présentent une activité antivirale contre le cytomégalo virus humain (HCMV) (Rechter et al., 2006). La micro-algue *Porphyridium purpureum* génère aussi des superoxydases dismutases (SOD), composés aux propriétés antiradicaux souvent utilisés dans le traitement de maladies chroniques telles que le SIDA et certaines variantes de cancers (Gorecki et al., 1991). Des produits cosmétiques anti-âge sont également élaborés en exploitant les propriétés antioxydantes des micro-algues.

I.14. Le plancton, acteur majeur de notre écosystème

I.14.1. Diversité des organismes planctoniques

Le terme « plancton » désigne les organismes qui habitent de vastes étendues d'eau et qui n'ont pas la capacité de se déplacer à contre-courant. Ainsi, ce terme englobe une variété d'espèces marines de tailles très différentes. Malgré leur taille généralement microscopique, les virus et organismes planctoniques peuvent varier en dimensions, allant des dimensions du picomètre pour certains d'entre eux à plusieurs mètres de longueur pour certaines méduses. Le plancton, qui comprend des virus, des bactéries, des archées, des protistes et des métazoaires, est défini davantage par une niche écologique que par une classification phylogénétique ou taxonomique.

On trouve donc dans le plancton divers groupes de micro-organismes, incluant principalement les procaryotes tels que les bactéries et les archées qui ne disposent ni de noyau ni de membrane interne. Il est à noter cependant que pour l'embranchement des cyanobactéries, ils possèdent une invagination de la membrane externe. Par la suite, on distingue les eucaryotes, des cellules plus sophistiquées qui renferment un noyau et divers organites comme les

IV. Etat de l'art

chloroplastes et les mitochondries, qui possèdent leur ADN propre, délimité par des membranes. Les eucaryotes englobent les protistes, y compris les Mamiellales et les métazoaires, un plancton animal reconnu pour sa multicellularité et son régime alimentaire hétérotrophe.

On entend par protiste les eucaryotes à une seule cellule, qui représentent plus de 85% de la diversité des eucaryotes. On distingue cinq super groupes d'eucaryotes dans cette classification, basée sur la phylogénétique proposée par Burki et al. en 2014 :

- ✓ Les Amibozoaires, des protistes hétérotrophes se déplaçant principalement par contraction cytoplasmique,
- ✓ les Excavés, qui partagent une structure appelée cytosome pour l'ingestion de petites particules alimentaires,
- ✓ les Opisthocontes, issus du regroupement récent de plusieurs taxons, y compris les champignons et les métazoaires,
- ✓ les SAR, qui englobent les Straménopiles, Alvéolés et Rhizaires et présentent donc une extrême diversité,
- ✓ les Archaeplastida ou lignée verte, qui possèdent un chloroplaste et sont capables de réaliser la photosynthèse, comprenant les Mamiellales.

I.14.2. Interactions entre le plancton et l'environnement

On distingue deux principales catégories de plancton sur le plan trophique : le phytoplancton et le zooplancton. Les organismes autotrophes, appelés premiers, sont la composante végétale du plancton qui a la capacité de réaliser la photosynthèse. Ils peuvent donc absorber le carbone inorganique en exploitant la lumière comme source d'énergie. Ainsi, ils jouent le rôle de producteurs primaires à l'origine de la chaîne alimentaire marine, dont le zooplancton herbivore viendra ensuite se nourrir. Celui-ci alimentera à son tour le zooplancton

IV. Etat de l'art

carnivore, qui représente les éléments animaux du plancton. Plus tard, ils serviront de nourriture pour les prédateurs dominants tels que les poissons ou les mammifères marins.

Outre ces organismes autotrophes ou hétérotrophes, le plancton abrite aussi une multitude d'organismes mixotrophes, capables de basculer entre la photosynthèse et l'absorption de proies en fonction des nutriments disponibles dans leur milieu ambiant. Certaines espèces pratiquent principalement la photosynthèse, tandis que d'autres sont majoritairement phototrophes, mais elles ont la capacité d'exploiter le second processus en complément pour leur survie.

Certains organismes sont également capables de vivre en symbiose, par exemple certains phytoplanctons avec de plus larges protistes hétérotrophes tels que des foraminifères ou des radiolaires.

Le phytoplancton, incluant des micro-algues unicellulaires et des bactéries photosynthétiques habitant les eaux superficielles, constitue environ 1% de la biomasse mondiale tout en étant à l'origine d'environ 50% de la production d'oxygène, comparable à l'ensemble des végétaux terrestres. En outre, ce phytoplancton favorise l'absorption d'une large portion du dioxyde de carbone atmosphérique : près de 30% du CO₂ généré par toutes les activités humaines est assimilé par les océans.

Ces organismes sont donc directement liés à la limitation de l'acidification des océans et du réchauffement climatique. Si le plancton meurt avant d'être mangé, les débris cellulaires vont couler des couches supérieures d'eau vers les fonds de l'océan faisant ainsi partie de la neige marine, de la même manière notamment que les déchets fécaux, pour être stockés dans les sédiments.

Ce mécanisme, connu sous le nom de pompe biologique, contribue à faire des océans les principaux puits de carbone de la planète, des zones naturelles qui captent plus de carbone qu'elles n'en libèrent. Ceci est le processus principal qui favorise la distribution verticale du

IV. Etat de l'art

carbone, complété par ce qu'on nomme la pompe physique ou pompe de solubilité. Elle contribue à la redistribution du carbone en profondeur, le rafraîchissement des eaux de surface dans les hautes latitudes facilitant la dissolution du dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère et augmentant sa densité. Ce processus rend possible la descente de ces particules lourdes vers les fonds marins, minimisant ainsi leur interaction avec l'atmosphère.

Cependant, il est important de souligner qu'une grande proportion du carbone qui se dirige vers la pompe biologique est décomposée en cours de route par les bactéries hétérotrophes. Ces dernières reminéralisent une partie de ce carbone organique en CO₂ via la respiration et réintègrent une portion de la matière organique dissolue dans la chaîne trophique : c'est ce qu'on appelle le cycle microbien.

Cette boucle microbienne favorise un recyclage efficace des matières organiques dissoutes et accroît l'activité photosynthétique dans les systèmes où la concentration en nutriments est limitée (Stone, L. & Weisburd, 1992).

1.14.3. Le zooplancton produit également du CO₂ par respiration

Ainsi, le plancton influence l'environnement, mais il est également susceptible d'être influencé par les changements environnementaux. Par exemple, des études ont démontré que l'acidification des mers pourrait induire un effet de rétroaction défavorable, provoquant une diminution de la capacité de stockage du carbone chez le phytoplancton austral d'ici la fin du siècle. Dans un cadre que l'on peut désigner comme « seascape » ou paysage marin, la composition des communautés planctoniques et les caractéristiques biogéochimiques des masses d'eau présentent une relation étroite. Habituellement, la prolifération du plancton est restreinte par l'accessibilité des nutriments dans les zones gyrestropiques et subtropiques, tandis que la luminosité joue fréquemment le rôle de facteur limitant dans les régions gyressubarctiques.

IV. Etat de l'art

Ces facteurs ont une influence sur le phytoplancton, qui à son tour affectera les niveaux supérieurs de la chaîne alimentaire. Il est aussi important de considérer l'effet du réchauffement des eaux sur les populations de phytoplancton. En effet, les fluctuations de température ont tendance à réduire la diversité des communautés et influencent le métabolisme de ces organismes. Bien que des macronutriments tels que le nitrate ou le phosphate soient abondants, certaines zones présentent une faible concentration de phytoplancton (Lewandowska, A. M., Hillebrand, 2014). Elles sont généralement associées à des zones oligotrophes, déficientes en micronutriments, et particulièrement en fer qui constitue un facteur limitant pour la croissance de ces organismes (Martin, J. H. & Fitzwater, 1988). Ainsi, un rapport direct est établi entre la croissance, la biodiversité et le métabolisme du phytoplancton d'un côté, et les conditions environnementales dans lesquelles il évolue de l'autre. En conséquence, ce phytoplancton influence son environnement en emmagasinant le carbone dissous et en occupant une position fondamentale dans la chaîne alimentaire marine.

I.14.4. Cycle de vie du phytoplancton

Les organismes du phytoplancton peuvent passer par quatre phases distinctes de leur cycle de vie : une phase de croissance, de reproduction sexuée, d'état de quiescence et de mort cellulaire. Ces transitions représentent un aspect essentiel pour saisir l'histoire des espèces et influencent leur distribution écologique ainsi que leurs rôles biogéochimiques. Néanmoins, ce cycle de vie demeure l'un des éléments les plus mal compris dans la biologie des algues moderne, notamment parce que certaines phases peuvent être sporadiques et complexes à observer, comme c'est le cas pour les cycles de reproduction sexuée (Von Dassow, P. & Montresor, M. Unveiling, 2011).

Il a longtemps été assumé que les protistes n'avaient pas de phases sexuelles (Tibayrenc, M., Kjellberg, F. & Ayala, 1990), les transitions vers ces phases étant souvent

IV. Etat de l'art

complexes à induire et contrôlées en conditions de laboratoire (Von Dassow, P. & Montresor, M. Unveiling, 2011), Ceci pose un défi lors de l'emploi de techniques d'observation traditionnelles, telles que la microscopie optique.

De plus, la mission est d'autant plus difficile lorsqu'il s'agit des protistes pico planctoniques en raison de leur taille infinitésimale et du manque de caractéristiques morphologiques suffisamment distinctives pour distinguer les variations entre les différentes phases.

Cependant, les méthodes contemporaines de la génomique ont contribué à formuler des hypothèses robustes sur l'aptitude de différents groupes de protistes à participer à la reproduction sexuée (syngamie et méiose), comme les Amibozoaires, les Dinoflagellés, les Diatomées, les Chrysophytes et les Mamiellales.

Par conséquent, des assemblages génomiques et des transcripteurs ont été utilisés pour identifier des gènes spécifiques ou liés au sexe, qui sont impliqués dans des processus tels que la fusion membranaire, la caryogamie et la méiose. De plus, des informations provenant de populations ont également montré des signes de recombinaison (Blanc-Mathieu, R. et al, 2017).

Aujourd'hui, le sexe est considéré comme une caractéristique ancienne et ubiquitaire de l'existence des eucaryotes.

I.14.5. Phylogénie des Mamiellales

Les Mamiellophyceae sont des algues vertes à une seule cellule, et elles constituent l'une des classes d'eucaryotes les plus significatifs sur le plan écologique (Monier, A., Worden, A. Z. & Richards, 2016). On les classe en trois catégories : les Monomastigales, qui sont des

IV. Etat de l'art

organismes que l'on trouve dans les eaux douces ; les Dolichomastigales, qui présentent une grande diversité dans les eaux marines, bien qu'ils constituent une fraction mineure des Mamiellophyceae ; et enfin les Mamiellales, la lignée la plus significative (Simmons, M. P. et al. 2016), que l'on retrouve généralement dans les eaux côtières mais aussi présents dans la zone épipélagique des océans (Treusch, A. H. et al., 2012).

On divise les Mamiellales en deux familles distinctes, les Mamiellaceae et les Bathycoccaceae, qui abritent de nombreux Chlorophytes largement distribués. La première catégorie comprend le genre omniprésent *Micromonas*, ainsi que les genres moins connus *Mantoniella* et *Mamiella*. Elle inclut aussi le genre *Bathycoccus*, qui est assez répandu, ainsi que *Ostreococcus*, le plus petit eucaryote connu à ce jour.

Morphologiquement, les Mamiellophyceae sont des entités de moins de 3µm. L'une de leurs spécificités, même si elle n'est pas présente dans certains genres, est l'existence d'écailles organiques non-minéralisées (principalement polysaccharides) qui prennent la forme d'une toile d'araignée. Chez *Bathycoccus*, *Mamiella*, *Mantoniella* et *Dolichomastix*, des portions de la surface cellulaire ainsi que du flagelle, s'ils sont présents, sont recouvertes par ces écailles. *Micromonas* et *Ostreococcus* n'ont pas d'écailles, *Bathycoccus* et *Ostreococcus* sont sans flagelles.

Les genres les plus étudiés parmi les Mamiellophyceae sont *Bathycoccus*, *Micromonas* et *Ostreococcus*. On trouve ces organismes en grande quantité dans l'océan et leur culture en laboratoire est relativement simple, ce qui favorise leur utilisation comme modèles biologiques et écologiques.

La réévaluation récente de la classification des espèces du genre *Micromonas* (Simon, N. et al. 2017) a permis de diviser l'espèce très répandue et variée *Micromonas pusilla* en quatre nouvelles espèces : *Micromonas pusilla*, *Micromonas commoda*, *Micromonas bravo* et *Micromonas polaris*, ainsi que deux autres candidates.

IV. Etat de l'art

On compte également quatre types d'*Ostreococcus* : *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus tauri* (Chrétiennot-Dinet, M.-J. et al, 1995), *Ostreococcus spp.* RCC809 et *Ostreococcus mediterraneus* (Subirana, L. et al, 2013), en plus de deux espèces de *Bathycoccus* : *Bathycoccus prasinos* 40 et TOSAG39-1 49, aussi connus sous les noms de clades BI et BII. Ces derniers possèdent une séquence d'ARN ribosomique 18S identique, ce qui les rend indiscernables par ce marqueur génomique traditionnellement employé.

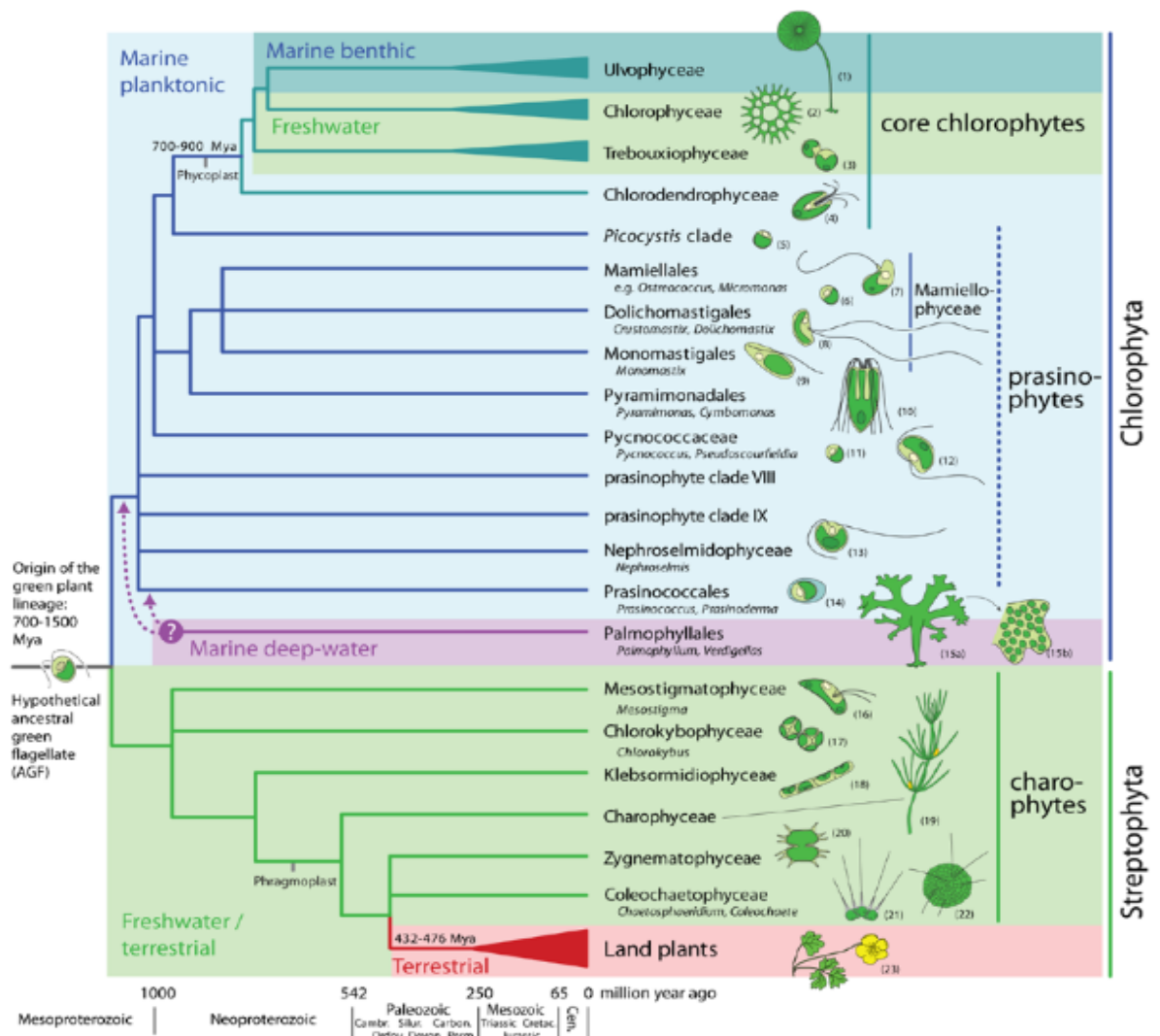


Figure 1 : Arbre phylogénétique des principales lignées vertes, en particulier aquatiques, basé sur des évidences moléculaires (Leliaert et al, 2011).

I.14.6. Biogéographie des Mamiellales

Les Mamiellales, même au sein d'un même genre, semblent se distinguer au niveau des niches environnementales qu'ils occupent. Par exemple, pour *Micromonas*, *M. pusilla* est typiquement océanique, *M. commoda* et *M. bravo* sont des espèces plutôt côtières tandis que *M. polaris* est une espèce trouvée en milieu arctique dans lequel elle peut être totalement dominante.

Des analyses visant à étudier la réponse à la luminosité ont permis de séparer deux types d'*Ostreococcus* : ceux adaptés aux hautes luminosités (*O. tauri*, *O. mediterraneus* et *O. lucimarinus*) et ceux adaptés aux basses luminosités (*O. RCC809*) 53. De plus, des études de la séquence ribosomique 18S suggèrent une différence de niche entre *O. tauri*, détecté plutôt dans les zones côtières ou les lagons, et *O. lucimarinus* et *O. RCC809* qui sont plus largement répartis en haute mer. Quant à *O. mediterraneus*, identifié plus récemment, il se trouve être l'espèce dominante parmi les Mamiellales en mer Méditerranée et dans des eaux chaudes sur des sites côtiers des deux rives de l'Atlantique⁵⁵. Enfin concernant *Bathycoccus*, la souche *RCC1105* correspondant à *Bathycoccus prasinos* a été définie comme adaptée à des milieux froids, abondant en milieu tempéré et arctique 45,56 tandis que *TOSAG39-1* peut au contraire se trouver dans des environnements plus chauds (Limardo, A. J. *et al*, 2017). Ces différences de préférences environnementales seront étudiées plus en profondeur dans le cadre de cette thèse.

Ostreococcus, contrairement à *Micromonas* et *Bathycoccus*, n'a jamais été reporté dans les eaux arctiques bien qu'il soit présent dans des eaux adjacentes recouvertes de glace saisonnièrement, telles que la mer Baltique ou la mer Blanche (Belevich, T. A. *et al*. 2018). Le phytoplancton est généralement caractérisé par sa grande abondance et sa large

IV. Etat de l'art

distribution, avec son succès écologique particulièrement illustré par un rythme de croissance rapide et une contribution considérable à la production primaire.

On constate également une hausse de la population de ces espèces de petite taille dans les eaux arctiques, tandis que l'on note une réduction des phytoplanctons plus volumineux au cours des dernières années dans un contexte de modifications climatiques. Toutefois, des études moléculaires montrent que de petits changements dans la disponibilité des nutriments ou l'intensité lumineuse peuvent provoquer d'importantes fluctuations de la population de Mamiellales⁶⁴. Étant donné leur impact sur les écosystèmes de plancton et leur sensibilité visible, l'étude de leur diversité et de leur biogéographie à une grande échelle est essentielle (Monier, A. et al. 2015).

I.14.7. Applications effectuées sur les Mamiellales

La classe des Mamiellophyceae présente une grande variété. Bien que les différentes espèces soient phylogénétiquement proches, il est notable qu'il y a de nombreuses souches génétiquement distinctes chez *O. tauri* et *O. mediterraneus*, par exemple.

Une étude récente (Krasovec, M., et al, 2017) s'est penchée sur le taux de mutations spontanées de certains Mamiellales, dans le but d'obtenir pour la première fois une estimation. Ceci pourrait contribuer à comprendre les modifications évolutives subies par ces algues vertes qui possèdent un grand nombre de gènes spécifiques à l'espèce. Par conséquent, les taux de mutation ont été établis pour *B. prasinos*, *M. pusilla*, *O. tauri* et *O. mediterraneus*.

Comme prévu, ces taux étaient plus élevés dans les régions intergéniques comparativement aux régions codantes. On observe également une hausse de ces taux dans les zones où la teneur en GC du génome s'écarte de sa valeur moyenne.

Ces espèces ont également fait l'objet d'une étude concernant l'accumulation de mutations (Krasovec, M. et al, 2016), en les soumettant à des conditions standards ou

IV. Etat de l'art

stressantes pour évaluer leur capacité d'adaptation. Seul *O. tauri* a montré une diminution de sa population considérée comme un indice de « fitness » pour cette expérience dans des conditions standards, cependant, l'accumulation de mutations s'accélère lorsque les lignées sont exposées à des conditions stressantes.

Les coefficients de sélection, déterminés à partir du nombre quotidien de divisions cellulaires, présentent des variations significatives selon les conditions environnementales, témoignant des impacts positifs et négatifs des mutations.

Pour finir, une récente recherche en génomique des populations a été menée sur une population naturelle d'*O. tauri* (Blanc-Mathieu, R. et al. 2017), examinant le polymorphisme à partir de 13 génomes complets de cellules prélevées en mer Méditerranée. Cette étude a révélé une grande variation génétique entre les organismes examinés, soutenant particulièrement la théorie de la présence d'un locus « mating-type » avec deux variantes sur le grand chromosome anomal.

Toutefois, cette recherche se concentre sur une région géographique limitée et ne facilite donc pas l'analyse des populations dans des contextes environnementaux très diversifiés.

La picoalgue choisie en tant que microorganisme modèle dans cette étude est *Ostreococcus tauri* une pico-algue verte isolée dans l'étang de Thau en 1994 (Courties et coll., 1994). C'est un des plus petits organismes eucaryotes connus à ce jour avec un diamètre cellulaire de 1 μm , contenant une seule mitochondrie et un seul chloroplaste. Sa structure cellulaire minimaliste, sa facilité de culture avec des conditions expérimentales simples, le séquençage de son génome et de deux autres génomes de ce genre d'*Ostreococcus* n font un modèle émergent en biologie cellulaire et végétale. Cependant, sa découverte étant récente, de nombreux points restent à préciser, comme par exemple sa capacité de remodelage cellulaire en fonction des conditions extérieures. Il est probable que cette capacité ait un lien

IV. Etat de l'art

avec la composition de sa membrane plasmique, en particulier lipidique (Derelle et coll., 2006). Ces points sont en cours d'étude dans mon groupe d'accueil, la pico-algue étant caractérisée par différentes microscopies (électroniques, MEB, TEM) ou de force atomique (AFM).

La membrane plasmique n'est pas le seul système membranaire présent dans cette algue. Dans le cadre de mes recherches de doctorales, je me suis intéressée aux lipides composant les thylakoïdes d'*O. tauri*, les thylakoïdes étant des empilements de membrane présents dans les chloroplastes et impliqués dans la photosynthèse. J'ai ainsi réalisé des systèmes modèles de ces membranes que j'ai étudiés par mesures de tension de surface et AFM.

II. Matériel et méthodes

IV. Matériel et Méthodes

II.1. Souches de microalgues utilisées

Au cours de mes investigations, j'ai requis plusieurs types d'algues : diverses espèces et/ou souches du genre *Ostreococcus* ainsi que d'autres microalgues qui font partie du même ordre, les Mamiellales. Sauf pour la variété d'*Ostreococcus tauri* (OTH95), toutes les autres sont issues de la Collection de Culture de Roscoff (RCC).

Les contaminations bactériennes ont été minimisées (aucune détection d'*O. tauri* par cytométrie en flux via des cycles de centrifugation/suspension et des traitements antibiotiques (Sigma-Aldrich) : Pénicilline à 1 mg.mL⁻¹, Streptomycine à 1 mg.mL⁻¹, Gentamycine à 0.5 mg.mL⁻¹.

Selon les souches le cocktail d'antibiotique est létal pour la souche et/ou inefficace et doit être adapté ; la cipro

II.1.1. Conditions de culture

II.1.1.1. Milieux de culture

On élève les microalgues selon une méthode en lot (batch), utilisant soit de l'eau de mer naturelle (NSW, 'Natural Sea Water'), soit de l'eau artificielle (ASW, 'Artificial Sea Water') enrichie en macro et micronutriments (environnement f/2) et complétée par des vitamines.

L'eau de mer authentique, extraite du bassin d'Arcachon (plages de la Lagune et du Petit Nice, La Teste de Buch), est gardée dans l'ombre pendant au moins 3 mois à une température de 22°C. Avant l'introduction de composés, la NSW subit un filtrage à 1,2 µm (GF/B Whatman). Le milieu f/2 (NSW ou ASW) est préparé à partir de nitrate de cellulose

IV. Matériel et Méthodes

(Whatman), puis soumis à une autoclave à 110°C pendant 30 minutes après avoir été filtré à 0.2µm.

De la même manière que l'eau de mer naturelle, l'eau ASW est supplémentée aux concentrations, après autoclavage, une solution de NaHCO_3 est ajoutée pour une concentration finale de 0.21 g.L⁻¹. Le pH de l'eau de mer artificielle est ajusté stérilement entre 8.12 et 8.25 et abaissé à 7,1 pour les expériences de marquage à l'acéate radiomarké, avec des solutions de NaOH 4M et HCl 10% filtrées sur 0.22 µm. La salinité de la solution est vérifiée au réfractomètre (3,5 %).

II.2. Méthodes biochimiques

II.2.1. Obtention de l'extrait lipidique

L'extraction des lipides se fait dans des milieux de solvants organiques de polarité variable qui, une fois combinés à une solution aquatique, favorisent la distribution des lipides dans la phase organique.

L'association la plus couramment employée comprend du chloroforme, du méthanol et de l'eau. Le protocole suivant est une adaptation de la technique de Folch et al. (1957) afin d'obtenir un rendement d'extraction d'au moins 95%,68 mesuré par le calcul des FAMES restants dans le résidu d'extraction et celui des FAMES provenant de l'extraction directe de la biomasse. L'estimation de la dégradation des lipides a été réalisée à l'aide de la chromatographie sur couche mince (CCM), en se basant sur l'identification des acides gras libres et de l'acide palmitique. Le BHT (hydroxytoluène butylé) est employé en tant qu'antioxydant dans l'ensemble des solvants à une concentration de 0,005% (solution mère à 25mg/ml, soit 1000 fois plus concentrée).

IV. Matériel et Méthodes

L'extraction se fait en deux étapes sur des culots représentant 180 mL de culture avec une densité cellulaire variant entre 3 et 12×10^7 cellules/mL. La première extraction au méthanol (0,5 ml) est effectuée en broyant avec un tissu lyser après l'ajout de deux billes de verre de 3 mm (5 cycles de 30 secondes à 30 Hz, suivis d'une pause de 30 secondes).

L'extraction se poursuit par l'ajout de 1mL de chloroforme BHT (chloroforme/méthanol final 2/1 v/v), ce qui correspond à trois nouveaux cycles avec le lyseur de tissus (3 cycles au total). Après la centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C), le surnageant est gardé dans un tube en verre à vis tandis que le culot subit une autre extraction à l'aide de 0.75mL de chloroforme : méthanol 2/1 (v/v). On collecte en tout 4.5 mL de surnageant.

La phase de séparation se fait en ajoutant 0.25 volume (1.125 mL) d'une solution aqueuse (0.9% NaCl, 50 mM Tris, pH7), puis en agitant l'échantillon et en le centrifugeant (3 000 g, 5 min). La phase organique inférieure est recueillie, tandis que la phase aqueuse supérieure subit une nouvelle extraction par agitation avec 1 mL de chloroforme. Les phases organiques sont regroupées.

Puis, l'étape organique complète est lavée avec un volume de 0.25 (6,25 mL) d'une solution de méthanol/solution aqueuse (0,9% NaCl, 50 mM Tris, pH7) en proportions égales (v/v). Après agiter et centrifuger (3 000 g, 5 min), la phase organique inférieure contenant les lipides est récoltée et concentrée par évaporation à l'azote. Par la suite, elle est reconcentrée dans 150 μ L de chloroforme/méthanol à 2/1 (v/v) contenant du BHT.

On obtient habituellement près de 20 μ g de lipides par mg de biomasse fraîche, ou plus simplement, en fonction du volume cellulaire : environ 5 μ g de lipides pour chaque mL de culture à une concentration approximative de 6×10^7 cellules/mL, soit 83 ng par million de cellules.

IV. Matériel et Méthodes

II.2.2. Récolte de la biomasse à étudier (extrait lipidique)

Selon les expérimentations ultérieures envisagées, la biomasse à récolter pour des cultures d'une densité de 30×10^{-6} cellules minimum correspond aux volumes suivants:

- ARN : 45 mL minimum par point
- Extrait lipidiques pour TLC : 180 mL
- Dosage direct des AG totaux : 45mL (25 mL possible pour une culture concentrée)
- Analyse des Acyl CoA : 90 mL
- Microscopie : 50 mL

Il faut procéder à la collecte sans tarder et sur de la glace. Il est nécessaire de procéder à deux centrifugations successives : la première (rotation de 15 à 200 mL, 4 400 g, 10 minutes, 4°C) a pour but de concentrer le matériel afin de le centrifuger ensuite à grande vitesse (12 000 g, 5 minutes, 4°C) dans des microtubes pour éliminer le plus grand volume possible de liquide. Si besoin, le matériel est promptement pesé avant d'être utilisé directement ou congelé dans de l'azote liquide et conservé à une température de -80°C.

Le protocole de préparation pour la microscopie diffère, car il interdit la conservation des échantillons et requiert des mesures supplémentaires pour minimiser les dommages aux cellules. Suite à une première centrifugation (5000g, 1 minute, 4°C), le résidu cellulaire est soigneusement resuspendu dans le milieu agrémenté de 10% de Ficoll 70 kD (cryoprotecteur) avant d'être centrifugé de nouveau (5000g, 1 minute, 4°C). Le volume d'eau restant après la centrifugation comprend le culot lâche. Selon Degraeve-Guilbault et al. (2017), on prélève 2 μ L de ce culot à l'aide d'une pipette tronquée pour continuer la préparation.

IV. Matériel et Méthodes

II.3. Méthode d'observation

Observation d'*O. tauri* en microscopie à force atomique

Cette méthode repose sur l'interaction d'une pointe de dimension nanométrique (la sonde) et la surface de l'échantillon. L'image de cette surface est obtenue par balayage suivant deux directions (x,y), les forces mises en jeu étant de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-6} N, pour une résolution latérale de l'ordre de l'angström (0.1 nm). La nature de ces forces est variable en fonction de la distance pointe-surface. Aujourd'hui un des champs privilégiés de l'AFM concerne l'étude des systèmes biologiques puis-qu'il est possible avec cet outil de réaliser des études non destructives en milieu liquide (in vivo) mais aussi en atmosphère contrôlée ou à l'air (Grauby-Heywang et coll. 2016 ; Mathelié-Guinlet et coll. 2019).

Dans cette section, nous allons expliquer en profondeur le concept de l'AFM, ainsi que les divers éléments et modes d'opération de cette méthode.

En raison de leur dimension réduite, l'examen des cellules d'*Ostreococcus tauri* requiert le recours à la microscopie électronique. Touria et moi avons modifié le protocole de préparation des échantillons pour la microscopie à force atomique.

Suite à la récolte, le culot cellulaire est soigneusement resuspendu dans 2mL de Ficoll 70-kD 10% (GE Healthcare Biosciences) en ASW d'intérêt pour favoriser la cryoprotection des cellules. Le prélèvement est placé dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL pour être soumis à une centrifugation (5 000g, 1 min, 4°C). La plupart du surnageant est évacué à l'aide d'une pipette, tandis que les près de 10 µL restant facilitent la résuspension délicate des cellules en les tapotant doucement. Les cellules sont par la suite maintenues au froid, placées dans des coupelles plates et congelées sous haute pression à l'aide d'un appareil EM- PACT1 (Leica). Par la suite, les échantillons sont remplacés à froid par de l'acétone pure mélangée à 1% d'osmium tétraoxyde grâce au système AFS2 (Leica).

IV. Matériel et Méthodes

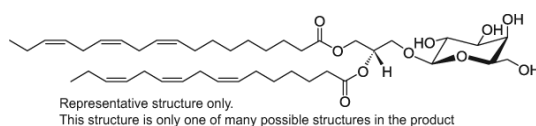
Les échantillons sont conservés à une température de -90°C pendant 48 heures, puis portés à la température ambiante en respectant un rythme de réchauffement de 3°C . Avant leur enchâssement, ils sont progressivement infiltrés avec de la résine Spurr (Electron Microscopy Science) et polymérisés à 70°C pendant 16 heures. Des sections ultrafines de 70 nm sont ensuite réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Reichert Ultracut S, puis examinées à 80 kV avec le microscope électronique à force atomique FEI Tecnai G2 Spirit TWIN 120 kV, qui est muni d'une caméra CCD Eagle 4k de 16 mégapixels. L'analyse des caractéristiques cellulaires est effectuée en utilisant le logiciel Image J.

II.4. Lipides algaux étudiés

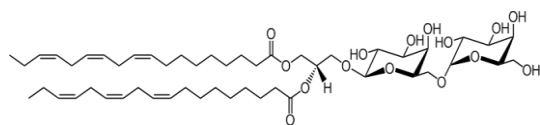
Le mot lipide fait référence à divers groupes de composés, hydrophobes ou amphiphiles, qui diffèrent structurellement et fonctionnellement, mais partagent la caractéristique commune d'une grande solubilité dans des solvants organiques et une faible solubilité dans l'eau. Ces composés remplissent diverses fonctions biologiques au sein des cellules, y compris celle d'être les éléments fondamentaux des membranes cellulaires (internes et externes). Parmi ces derniers, les galactolipides sont des lipides élaborés possédant deux chaînes hydrophobes ainsi qu'une tête polaire formée d'un ou plusieurs groupes galactose. Ils constituent près de 80% des thylakoïdes et contribuent de manière significative à leur structure. Dans le contexte de cette thèse, notre étude s'est concentrée sur deux types différents de galactolipides. On parle ici de lipides commerciaux (Avanti Polar Lipids), des MGDG et DGDG non-ioniques.

Monogalactosyl-diacylglycérol

MGDG (56%)



(29%)



IV. Matériel et Méthodes

la réduction de l'aire moléculaire moyenne A et l'accroissement de la pression de surface π (comme indiqué ci-dessous), ce qui nous permet d'établir l'isotherme de compression $\pi = f(A)$. Cela nous fournira des informations sur les états physiques successifs de la monocouche en réponse à sa compression.

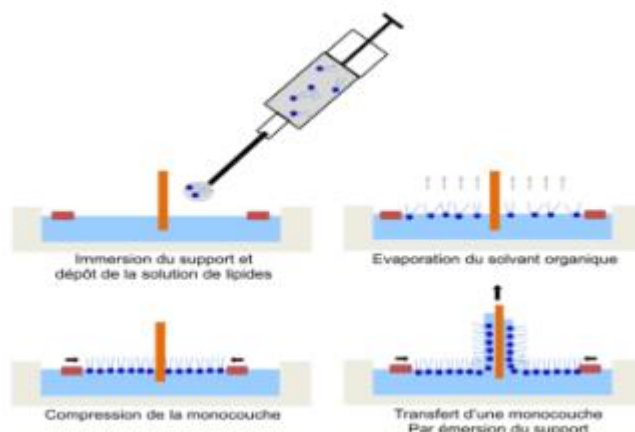


Figure 3 – Cuve de Langmuir vue de profil et technique de transfert Langmuir-Blodgett (Faye N.R, 2014)

II.5.1. Pression de surface

La pression de surface π est définie comme la différence entre la tension de surface à l'interface air/eau pure et à l'interface air/eau+lipide. La méthode de Wilhelmy est utilisée pour mesurer la tension de surface γ , tandis que le logiciel contrôlant la cuve se charge de calculer la pression de surface. Cette technique se base sur l'emploi d'une lame rectangulaire (papier de chromatographie de dimensions spécifiques) immergée dans la phase aqueuse et connectée à un tensiomètre. Cette lame est alors exposée à l'effet combiné de trois forces :

$$\sim F = \sim P + \sim PA + \sim F\gamma \quad (2.1)$$

où $\sim P$ est le poids de la lame, $\sim PA$ la poussée d'Archimède et $\sim F\gamma$ la force de tension de

IV. Matériel et Méthodes

surface.

Une procédure de tare et de calibration du tensiomètre permet « d'éliminer » le poids de la lame

dans cette équation. De plus, la lame est immergée au minimum, à la limite de l'arrachement, ce qui permet de négliger la poussée d'Archimède. Par définition, nous avons :

$$F\gamma = \gamma \times L \times \cos \theta \quad (2.2)$$

Avec γ représentant la tension de surface, L symbolisant le périmètre de la lame au point où elle touche la surface de l'eau, et θ désignant l'angle de raccordement. Lorsque la lame est à la frontière de l'arrachement, cet angle se rapproche de 0.

L'évaluation de la force donne alors la possibilité d'obtenir la tension de surface à chaque moment du processus de compression, et par conséquent, la pression de surface, indiquée en mN/m :

$$\Pi = \gamma_{\text{eau}} - \gamma_{\text{film}} \quad (2.3)$$

La tension de surface à 20°C pour de l'eau pure est $\gamma_{\text{eau pure}} = 72 \text{ mN/m}$

Aire moléculaire moyenne et isotherme de compression

L'aire moléculaire moyenne est définie comme le rapport de la surface S entre les deux barrières sur le nombre de molécules étalées, soit :

$$A = S$$

$$n \times N \quad (2.4)$$

Avec S la surface de la cuve, n le nombre de moles déposées à la surface et N le nombre d'Avogadro. Cette aire moléculaire moyenne sera donnée en $\text{\AA}^2$, unité bien adaptée compte-tenu des dimensions des molécules.

En général, à mesure que la compression progresse, l'aire moléculaire moyenne tend à se réduire tandis que la pression de surface a tendance à s'intensifier. Comme mentionné précédemment, le graphique qui illustre la pression de surface en rapport avec l'aire moléculaire est connu sous le nom d'isotherme de compression. Les isothermes fournissent des renseignements sur la structuration des lipides à l'interface, ces derniers étant susceptibles de varier en fonction de la nature et des caractéristiques du lipide, ainsi que des conditions expérimentales...

II.5.2. Isotherme théorique d'un lipide

Lors de la compression les molécules peuvent transiter par plusieurs phases d'organisations différentes décrites sur la Figure 4. Selon la nature du lipide et les conditions expérimentales, toutes les phases décrites ci-dessous ne sont pas accessibles.

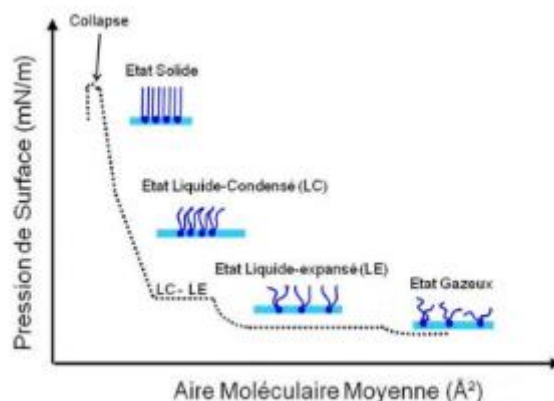


Figure 4 – Modèle général d'isotherme de compression d'une monocouche lipidique (Faye N.R, 2014)

Lors des premiers stades de compression, les molécules se situent à une distance considérable les unes des autres : on estime alors que le film est en phase gazeuse bidimensionnelle et que la pression est par conséquent inexistante.

En poursuivant la compression, les lipides se rapprochent, mais gardent leurs chaînes carbonées désorganisées dans un premier temps : ils sont alors dans une phase "liquide expansé". Il y a peu d'interaction entre les molécules et les chaînes sont peu organisées. Si la compression

se poursuit, le film passe en phase "liquide condensé". Les interactions entre les molécules, en particulier entre les chaînes carbonées, sont plus fortes. Les chaînes sont plus ordonnées et étirées.

En continuant la compression, les molécules passent à la phase solide où les interactions entre les chaînes carbonées sont maximales.

À ce stade, la moyenne de la surface moléculaire illustre la section droite du lipide. En fin de compte, si l'on pousse la compression de la monocouche au-delà de cette phase solide, l'espace entre les deux barrières devient trop petit pour accueillir toutes les molécules : la

IV. Matériel et Méthodes

monocouche se fissure et des empilements se mettent en place localement d'une manière irréversible. C'est la chute.

Technique de transfert Langmuir-Blodgett

Une fois la monocouche à l'interface air/eau ainsi réalisée, nous pouvons la transférer sur un support plan pour former un film de Langmuir-Blodgett, afin de pouvoir étudier ensuite ce système par AFM. Nous utilisons un support hydrophile, le mica. Celui-ci est immergé dans la phase aqueuse avant l'étalement, perpendiculairement à l'interface air-eau (Figure 3). Une fois la monocouche étalée et comprimée à la pression de surface souhaitée, le support est émergée de l'eau à une vitesse de transfert de 2 mm/min : la monocouche est alors transférée de l'interface air-eau sur le support.

Au cours du transfert, la pression de surface est maintenue constante, afin que l'organisation lipidique soit similaire à celle à l'interface et identique du début à la fin du transfert : Ainsi, pour pallier la perte de molécules à l'interface, la surface entre les deux barrières est réduite, garantissant ainsi une cohésion stable des molécules du commencement jusqu'à la conclusion du transfert. Le film obtenu est soigneusement gardé à l'écart de la poussière et examiné rapidement par AFM après le transfert afin de prévenir toute détérioration.

Instrumentation

L'échantillon est déposé à la surface d'un scanner piézoélectrique permettant son déplacement dans les trois directions de l'espace. La sonde de l'AFM est un microlevier au bout duquel est fixée une pointe dont l'apex (bout de la pointe) est assimilé à une sphère de rayon nanométrique.

Un faisceau de lumière provenant d'une diode laser est concentré à la pointe du microlevier, puis renvoyé par un miroir vers des photodiodes (Figure 5). Pendant l'examen (x,y) de la surface à l'aide de la sonde, en fonction des interactions entre l'apex de la pointe et la surface

IV. Matériel et Méthodes

de l'échantillon, le micro levier peut se déformer verticalement et/ou réaliser un déplacement par torsion. Cela déplace le point d'intersection du faisceau sur la photodiode, provoquant ainsi un changement des courants recueillis sur les quatre quadrants de la photodiode.

Ces variations de signaux permettent d'inférer la topographie de la surface étudiée. Le microlevier-pointe est perçu comme un ressort dont la constante de rigidité k peut fluctuer de quelques centièmes à plusieurs dizaines de N/m, selon ses caractéristiques géométriques et les matériaux qui le constituent (Figure 5). La mesure de la force d'interaction entre la pointe et la surface, F , en équilibre avec la force de rappel du ressort, s'effectue par le biais de la déflexion du levier due à son interaction avec la surface de l'échantillon. Selon la loi de Hooke, cette force F est proportionnelle à la constante de rigidité k :

$$F = k \times z \quad (2.5)$$

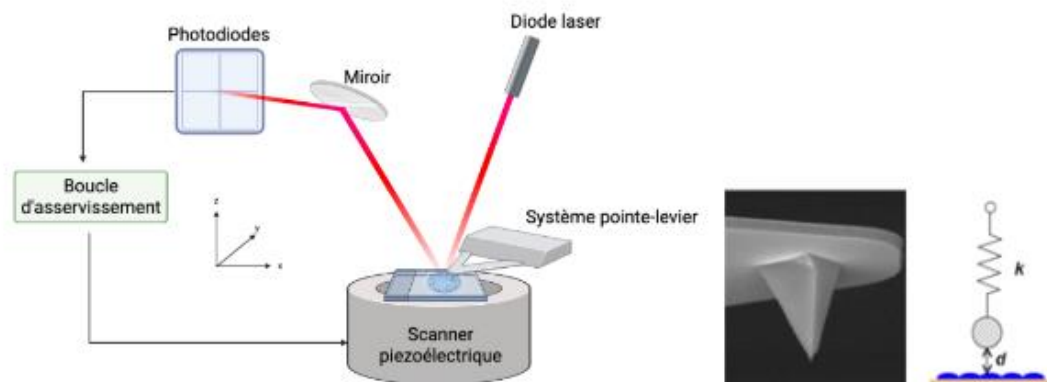


Figure 5 – À gauche schéma du dispositif d'AFM ; à droite le système pointe-micro-levier assimilable à un ressort (Faye N.R., 2014) avec z la déflexion vertical du levier.

IV. Matériel et Méthodes

Il est essentiel de contrôler la force appliquée à la sonde afin d'éviter tout dommage à sa surface par la pointe (ou vice versa). Ainsi, un système de contrôle associe les données recueillies par la photodiode à l'emplacement de la céramique piézoélectrique. Il ajuste la position de l'échantillon en fonction de z pour préserver une force d'interaction constante entre la pointe et l'échantillon, en relation avec la force cible spécifiée par l'utilisateur. L'écran représente alors les mouvements effectués par le piézo sous forme d'image. L'échelle des hauteurs est traduite par une variation de couleur (contraste), les images de hauteur donnant la topographie de la surface. En mode asservi, et en fonction de la taille de la zone sondée, l'acquisition du signal peut être ajustée en agissant sur les gains de la boucle de contre-réaction (intégrale et proportionnelle) et la fréquence de balayage (en Hz) qui définit la vitesse de balayage (en $\mu\text{m/s}$) de la sonde.

Modes de fonctionnement

Avec l'AFM utilisé dans le cadre de ce stage, 3 modes d'utilisation sont possibles : le mode contact, le mode "tapping" et le mode non-contact. Je me focaliserai plutôt sur le deuxième mode de fonctionnement puisque c'est celui que j'ai utilisé (voir Annexe).

Mode "tapping"

Pour le mode « tapping », nous commençons par la traçabilité d'une courbe de résonance en actionnant le levier à une tension spécifique et en générant des oscillations sur une plage de fréquences. Cela nous permet de déterminer les caractéristiques de cet appareil, sa fréquence de résonance ainsi que son facteur de qualité. Nous établissons aussi une amplitude de variation A_{libre} qui se distingue de la surface, ainsi qu'une amplitude opérationnelle A_W à travers le septième point. Par la suite, nous utilisons une technique qui va de la pointe à la surface (grâce à un moteur), et dès que l'objectif fixé est atteint (spv), le moteur se désengage

IV. Matériel et Méthodes

et le dispositif piézoélectrique prend le relais en scannant la surface selon les axes (x, y). Le contrôle en boucle permet de préserver une amplitude d'oscillation stable.

Cette méthode nous fournit également trois informations additionnelles : le profil de la surface de l'échantillon (ou rendu en 3D), l'indicateur de phase qui apporte des détails sur les caractéristiques mécaniques de la surface (rigide, flexible, visco-élastique, etc.), et enfin le signal d'amplitude, aussi appelé signal d'erreur, qui correspond à la différence entre la valeur cible et celle observée. L'image produite est instructive, puisqu'elle illustre toutes les variations de la topographie de surface.

Des modes de fonctionnement de l'AFM

➤ Mode contact

Le mode contact nécessite de maintenir la pointe de l'AFM en contact ($d \approx 2 \text{ \AA}$) avec la surface de l'échantillon tout au long du processus de mesure. On peut choisir de conserver la hauteur (mode non asservi) ou la déviation (mode asservi). Nous avons choisi de garder la déviation (force) constante grâce au mécanisme de contrôle. En mode contact, il est possible de déterminer la force de soutien (force appliquée) en fixant une déviation opérationnelle à travers le spv (point d'ajustement). Cette approche opérationnelle fournit plusieurs informations : Indication de la hauteur (mouvement vertical du piezo en mode contrôlé ou déviation du levier en mode non contrôlé)

➤ Mode de spectroscopie - Courbe de force

La courbe de force illustre la force d'interaction entre la pointe et la surface en fonction de l'écart qui les sépare. La Figure 6 illustre une courbe de force standard.

La mesure commence avec le microlevier loin de la surface (A) : l'interaction pointe-surface n'est pas suffisante pour défléchir le microlevier (aucune déflexion du levier). C'est la ligne

IV. Matériel et Méthodes

de base qui définit la force nulle. On diminue alors, pas à pas, la distance Z entre la pointe et la surface. À une certaine distance, le gradient de force d'interaction pointe-surface devient supérieur à la constante de raideur du microlevier : la pointe vient au contact de la surface (B). Le microlevier est défléchi vers le bas (vers la surface) : la force est alors négative. En continuant à diminuer la distance Z , on passe par la situation (C), dans laquelle le microlevier est non défléchi (force nulle), la pointe étant en contact avec la surface. Une nouvelle diminution de la distance Z entraîne alors une déflexion positive du microlevier (vers le haut, à l'opposé de la surface), due à la répulsion de cœur dur (la force est positive, situation (D)).

On augmente à nouveau la distance Z (« retrait » de la pointe) : le levier ne décolle pas, la courbe n'est pas superposée à la précédente, mais présente un cycle d'hystérésis entre l'approche et le retrait, dû à l'adhésion de la pointe sur la surface (situation (E)). Enfin, lorsque la force élastique due à la déflexion du levier devient plus grande que la force d'adhésion pointe-surface, la pointe se décroche de la surface. C'est le saut « hors contact », on revient à la ligne de base (situation (A)).

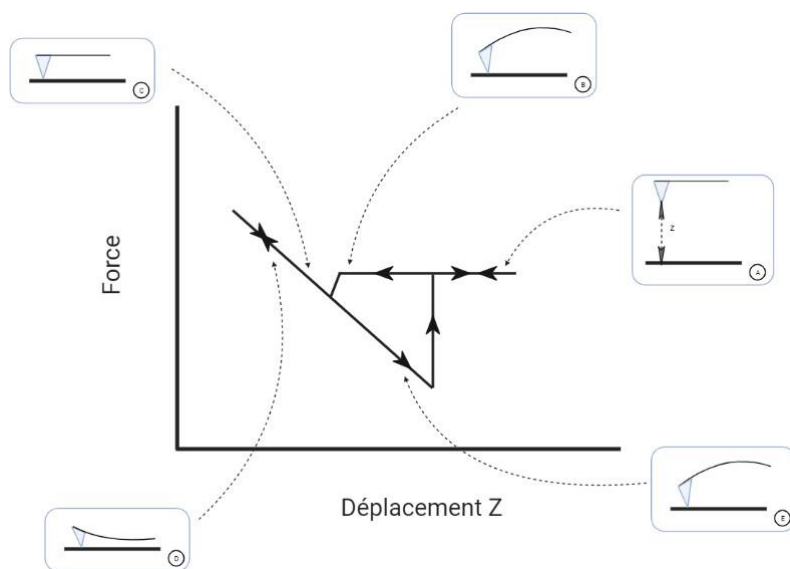


Figure 6 – Modèle de courbe de force

IV. Résultats

1. Introduction

Les membranes biologiques sont cruciales pour l'organisation et le fonctionnement des cellules. Non seulement elles garantissent la distinction entre divers compartiments, mais elles interviennent aussi de manière proactive dans plusieurs processus biologiques, comme le transport, la communication cellulaire ou la transformation de l'énergie. L'élasticité, la stabilité et la capacité à se réarranger de ces membranes sont étroitement liées aux caractéristiques et à l'agencement des lipides qui les constituent.

Certaines membranes, en particulier celles impliquées dans la conversion de l'énergie, comme les membranes des thylakoïdes chez les plantes ou la membrane interne mitochondriale, présentent une organisation lipidique spécifique. Elles contiennent une proportion importante de lipides dits *non-bicouches*, capables d'adopter des structures différentes de la bicouche lamellaire classique. Ces lipides confèrent aux membranes une grande flexibilité structurale, indispensable à leur fonctionnement et à leur adaptation aux contraintes mécaniques et environnementales.

Parmi ces lipides, les galactolipides monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et digalactosyldiacylglycérol (DGDG) occupent une place centrale dans les membranes photosynthétiques. Bien qu'ils partagent une composition chimique proche et un fort degré d'insaturation, leurs comportements structuraux diffèrent nettement. Le DGDG, de géométrie globalement cylindrique, s'organise préférentiellement en phases lamellaires stables et contribue à la stabilisation des bicouches membranaires. À l'inverse, le MGDG, de forme conique, appartient à la famille des lipides non-bicouches et présente une forte tendance à former des structures non lamellaires, telles que des phases hexagonales inversées ou des micelles inversées.

IV. Résultats

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériels

Le MGDG et le DGDG ont été fournis par Avanti Polar Lipids (USA, références 850523 et 850524 respectivement) sous forme de poudres. La Figure 1 et le Tableau 1 montrent leur structure moléculaire ainsi que la nature de leurs acides gras et leurs pourcentages. On a utilisé les lipides sans procéder à une purification supplémentaire.

Les solutions lipidiques ont été réalisées en utilisant un mélange de méthanol et de chloroforme de pureté HPLC (Sigma-Aldrich, France) dans un rapport 1/2 en volume à une concentration de l'ordre de 1 mg/mL. Elles ont été stockées à une température de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour prévenir toute décomposition par oxydation du fait de la présence de nombreuses doubles liaisons dans les chaînes d'acide gras.

La nature de la sous-phase dans les expériences de tension de surface était de l'eau ultrapure Millipore (avec une résistivité supérieure à $18,2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ et un pH s'approchant de 5,6).

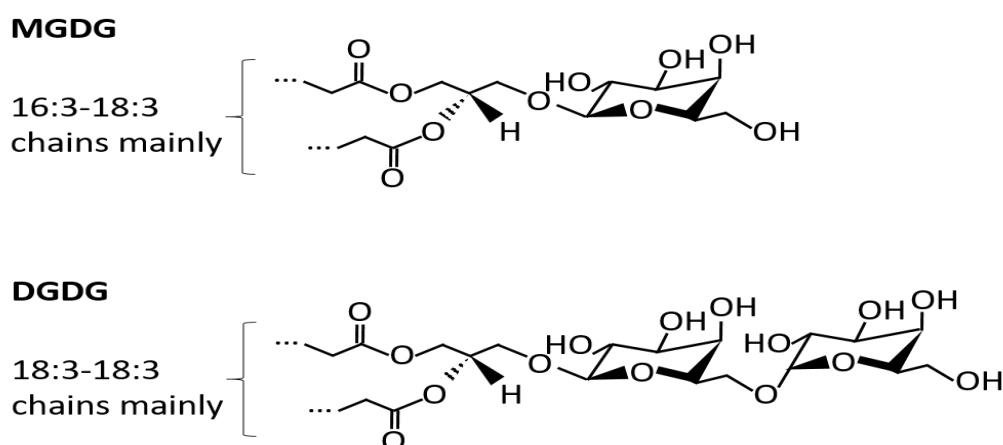


Figure 1. Structure chimique du MGDG et DGDG

Tableau 1 Nature et pourcentage des acides gras, masses moléculaires moyennes des MGDG et DGDG utilisés dans cette étude (données issues d'Avanti Polar Lipids) et indices de double liaison

IV. Résultats

(DBI) correspondants. Les DBI de molécules similaires utilisées dans d'autres références sont indiqués à titre comparatif

Fatty acids (our study)	MGDG	DGDG
18:3-18:3	14.1 %	44.5 %
18:2-18:3	3.2 %	10.7 %
16:3-18:3	66.8 %	21.3 %
16:3-18:2	19.2 %	7.0 %
16:1-18:3	-	6.9 %
16:0-18:3	-	9.7 %
Average molecular weight	752.4	926.8
Corresponding DBI	2.987 – 3.0	2.7
DBI in Bottier, 2007	1.96	1.85
Wheat flour		
DBI in Gzyl-Malcher, 2008	0.82 (inflorescences)	0.96 (inflorescences)
Wheat tissues	0.23 (embryos)	0.58 (embryos)

2.2. Indice de double liaison (DBI) du MGDG et du DGDG

Les valeurs de DBI du MGDG et du DGDG ont été calculées selon l'équation suivante (Da Costa *et al.*, 2019) :

$$DBI = \frac{\sum(\text{pourcentage relatif des lipides} \times N)}{100}$$

Où N correspond au nombre de doubles liaisons présentes dans les acides gras insaturés.

À titre d'illustration, si 3.2 % des chaînes acyl du MGDG sont constituées d'acides gras 18:2 et 18:3, leur contribution au DBI total est calculée comme suit :

$$(1.6 \times 2 + 1.6 \times 3) / 100 = 0.08$$

Le DBI représente le nombre moyen de doubles liaisons par chaîne d'acide gras dans le mélange. Le même procédé de calcul a été utilisé pour les lipides comparables cités dans les publications lorsque la répartition des acides gras était disponible. Le Tableau 1 contient l'énumération de toutes les valeurs calculées.

IV. Résultats

2.3. Mesures de pression de surface et transfert Langmuir-Blodgett

Les expériences de tension superficielle ont été réalisées à une température de 20 ± 1 °C en utilisant une cuve de Langmuir de la société NIMA ($30,0 \text{ cm} \times 10,0 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$), dotée de deux barrières symétriques et d'une balance de Wilhelmy (NIMA).

Du papier de chromatographie (1 cm de largeur, changé régulièrement) a été utilisé comme lame de Wilhelmy pour la mesure de la tension de surface.

Les solutions lipidiques ont été déposées à l'interface air-eau à l'aide d'une seringue Hamilton. Un temps de 20 minutes a été respecté suite à l'étalement pour l'évaporation des solvants, puis les molécules ont été comprimées à une vitesse de $5 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$. Les isothermes de compression liant la pression de surface à l'aire moléculaire moyenne (π -A) obtenues ont permis d'évaluer entre autres l'élasticité de la monocouche via le module de compression.

Où A_π indique l'aire moléculaire moyenne mesurée à une pression π spécifiée. Une valeur de C_S^{-1} élevée indique une faible élasticité interfaciale, donc une monocouche rigide.

La technique de Langmuir-Blodgett a été utilisée pour transférer les monocouches depuis l'interface air-eau sur les supports destinés à l'imagerie AFM. Selon Oliveira *et al.* (2022), les éléments cruciaux qui affectent la qualité du dépôt comprennent la pression de surface exercée, le type de support utilisé ainsi que la vitesse d'émersion du support, un transfert lent étant préconisé pour conserver une organisation moléculaire identique entre l'interface air-eau et le support.

Dans cette étude, nous avons effectué les transferts dans des conditions standards, en suivant les protocoles déjà adoptés dans de précédents travaux (Faye *et al.*, 2013a ; Faye *et al.*, 2013 ; Grauby-Heywang *et al.*, 2016). Une lame de mica fraîchement clivé a été fixée à l'aide d'une pince à un support relié à un moteur permettant son déplacement vertical à une vitesse contrôlée. La lame a été immergée dans la sous-phase avant l'étalement de la monocouche. Les molécules ont ensuite été

IV. Résultats

comprimées jusqu'à obtenir la pression de surface désirée, qui se situe entre 20 et 28 mN·m⁻¹. Dans cette plage de pression les interactions intermoléculaires sont suffisantes pour assurer leur cohésion dans le film, sans toutefois atteindre les conditions qui provoquent le collapse (« effondrement » entraînant la formation irréversible de multicouches). Elle a par ailleurs un sens d'un point de vue biologique.

Une fois cette pression atteinte, elle a été maintenue constante par un système d'asservissement assurant l'ajustement continu de la surface entre les barrières. Après une attente de 2 minutes, le mica a ensuite été émergé de la cuve, à une vitesse lente et régulière de 2 mm·min⁻¹. Après leur transfert, les films Langmuir-Blodgett ont été protégés de la poussière et examinés rapidement au microscope AFM pour minimiser toute détérioration potentielle par oxydation des chaînes insaturées du MGDG ou du DGDG. Plusieurs échantillons indépendants ont été élaborés dans des conditions similaires, et diverses zones ont été étudiées pour s'assurer de la reproductibilité des observations.

2.4. Microscopie à Force Atomique (AFM)

Les images AFM ont été réalisées à une température de 20 ± 1 °C à l'aide d'un dispositif Bioscope II (Veeco–Bruker, Santa Barbara, CA) muni d'un scanner G qui offre un champ de balayage maximal de $150\text{ }\mu\text{m} \times 150\text{ }\mu\text{m} \times 12\text{ }\mu\text{m}$ sur les axes XYZ.

Nous avons procédé à l'analyse de nos échantillons en utilisant la méthode du tapping avec des pointes en silicium PPP-NCL (NANOSENSORS™), qui possèdent une constante de ressort approximativement de 32 N/m et une fréquence de résonance mesurée avoisinant les 165 kHz.

Toutes les acquisitions ont été effectuées à l'air libre, avec une fréquence de scan variant entre 0,3 et 1 Hz, selon la taille de l'image et le mode d'acquisition.

IV. Résultats

Nous avons traité les données recueillies en utilisant les programmes Nanoscope (version 7.30, Veeco) et Gwyddion. Pour chaque zone examinée, six images ont toujours été enregistrées et analysées simultanément :

- images de hauteur trace et retrace (topographie),
- images d'amplitude trace et retrace (signal d'erreur),
- images de phase trace et retrace (propriétés mécaniques), toutes acquises en mode tapping.

Dans le manuscrit, les images à 2 dimensions ont été privilégiées pour une lecture plus claire et exploitable. Les profils de hauteur ont été obtenus directement à partir des images topographiques.

3. Résultats

La Fig. 2 montre les isothermes de compression π -A obtenues suite à l'étalement de 20 nmol de MGDG ou de DGDG à l'interface air-eau. Dans les deux cas, les lipides restent dans une phase liquide-expansé pendant la compression, avec des aires moléculaires au démarrage d'environ 180 Å² pour le MGDG et 160 Å² pour le DGDG.

IV. Résultats

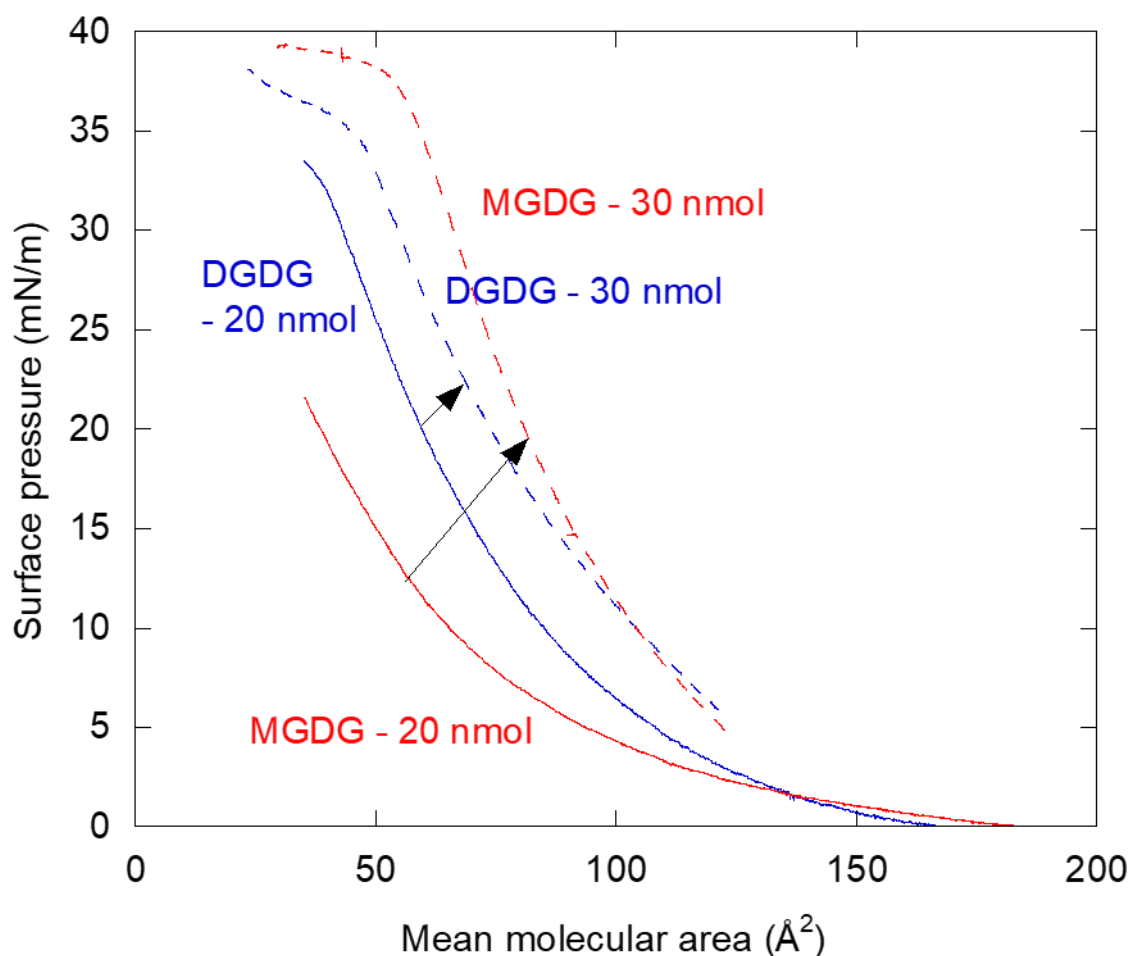


Figure 2. Isothermes π -A du MGDG (en rouge) et du DGDG (en bleu), les monocouches étant obtenues par étalement de 20 nmol (traits pleins) et 30 nmol (traits pointillés). Les flèches indiquent le déplacement de l'isotherme lorsque le nombre de molécules augmente.

Durant la compression, la monocouche de DGDG peut atteindre des pressions relativement élevées, avec une aire moléculaire moyenne d'environ 41 Å^2 à $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, sans toutefois parvenir clairement au collapse, la taille de la cuve étant un facteur limitant. Par contre, en ce qui concerne le MGDG, les aires moléculaires sont systématiquement plus faibles (par exemple 43 Å^2 à $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) et la pression de surface ne peut dépasser $22 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

IV. Résultats

Une comparaison avec les isothermes précédemment publiés pour des MGDG et DGDG insaturés révèle une tendance similaire (Bottier *et al.*, 2007 ; Gzyl-Malcher *et al.*, 2008 ; Georgiev *et al.*, 2012). Toutefois, les aires au démarrage des isothermes constatées ici sont plus importantes, ce qui est dû à la prépondérance des chaînes polyinsaturées des lipides utilisés ici (16:3–18:3 pour MGDG et 18:3–18:3 pour DGDG). La forte valeur du DBI de ces lipides favorise une expansion moléculaire plus importante, en accord avec les observations de Hoyo *et al.* (2016).

En ce qui concerne les aires moléculaires moyennes à pression de surface élevées, les valeurs que nous avons obtenues sont considérablement plus faibles que celles mentionnées dans d'autres études. Georgiev *et al.* (2012) mentionnent une aire moléculaire moyenne approximative de $80 \text{ \AA}^2$ à $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ pour le MGDG, alors que Bottier *et al.* (2008) signalent $110 \text{ \AA}^2$. Au contraire, Gzyl-Malcher *et al.* (2008) obtiennent une valeur similaire à la nôtre ($\sim 45 \text{ \AA}^2$). Pour le DGDG, l'aire moléculaire moyenne sur l'isotherme est également supérieure à celles rapportées précédemment, avec une valeur autour de $60 \text{ \AA}^2$ à 30 mN/m .

Dans ces conditions expérimentales initiales (étalement de 20 nmol), le transfert des monocouches sur mica s'est avéré impossible : la pression nécessaire au transfert n'a pas pu être obtenue, ou l'espace disponible entre les barrières était trop limité pour assurer un contrôle stable de la pression. L'unique option était d'accroître la quantité de lipide déposée. Par conséquent, la Fig.2 illustre aussi les isothermes obtenus suite au dépôt de 30 nmol .

Dans cette seconde situation, la pression initiale n'est plus nulle, mais d'environ 5 mN/m : la phase gazeuse et la transition vers la phase liquide expansé ne sont donc pas observables. Par ailleurs, on note une augmentation spontanée de la pression au cours des 20 minutes d'évaporation après le dépôt ($+1,7 \text{ mN/m}$ pour DGDG et $+2,0 \text{ mN/m}$ pour MGDG). Enfin, les isothermes obtenues par étalement de 20 nmol ne coïncident pas avec celles obtenues par étalement de 30 nmol :

- Elles sont décalées vers des aires moléculaires moyennes plus élevées ;

IV. Résultats

- Les isothermes DGDG demeurent parallèles (elles sont simplement décalées l'une par rapport à l'autre), alors que celles du MGDG ont des inclinaisons différentes, celle à 30 nmol étant plus marquée.

Pour une caractérisation plus précise de ces isothermes, nous avons calculé le module de compression pour toutes les monocouches à diverses pressions de surface (Fig. 3).

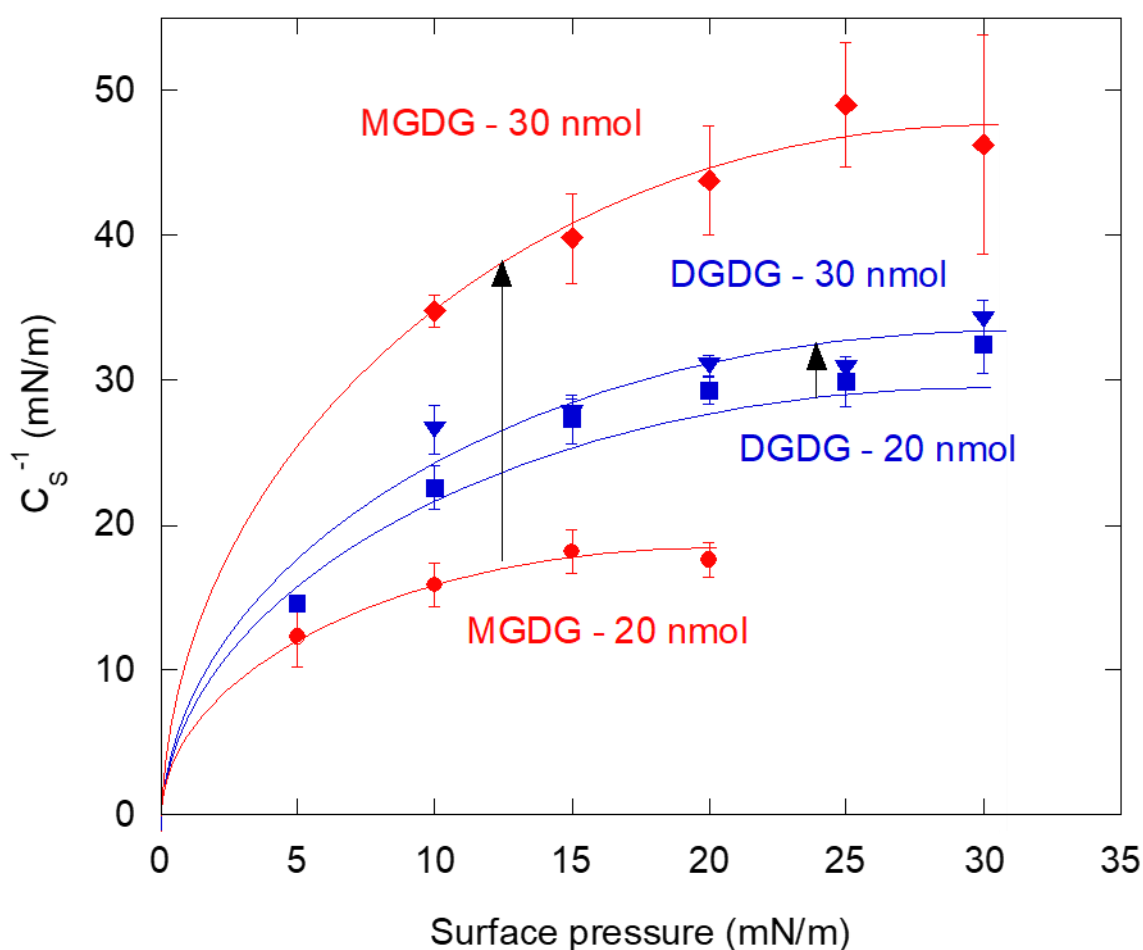


Figure 3 Module de compression (C_s^{-1}) en fonction de la pression de surface dans les monocouches de MGDG (en rouge) et de DGDG (en bleu), obtenues par étalement de 20 nmol (cercles et carrés) et de 30 nmol (triangles et losanges). Les flèches indiquent le décalage lors de l'augmentation du

IV. Résultats

nombre de molécules, tandis que les courbes servent de guide visuel. Une valeur élevée de C_s^{-1} indique une faible élasticité interfaciale, correspondant à une monocouche moins flexible.

Les valeurs du module de compression augmentent logiquement avec la compression dès le début de la compression, mais elles atteignent rapidement un plateau tout en demeurant faibles. Elles se situent dans un ordre de grandeur comparable à ceux rapportés pour des monocouches constituées de MGDG et DGDG insaturés présentant des indices DBI inférieurs ou équivalents (Gzyl-Malcher *et al.*, 2008 ; Hoyo *et al.*, 2016), mais également pour des monocouches composées d'hexadécylphosphocholine, un lipide anti-tumoral (Wnetrzak *et al.*, 2013), ou de triglycérides insaturés (Azémard *et al.*, 2022). Par contre, les valeurs de C_s^{-1} observées pour le palmitoyl-oléoyl-phosphatidylcholine (POPC), un phospholipide ayant une chaîne insaturée qui reste également en phase liquide expansée, varient entre 35 et 85 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ dans des conditions expérimentales similaires (Grauby-Heywang *et al.*, 2016).

L'impact du nombre de molécules étalées sur les valeurs de C_s^{-1} est fonction du type de lipide. Pour le DGDG, il est presque insignifiant, tandis que les valeurs de C_s^{-1} augmentent nettement avec le nombre de molécules dans le cas du MGDG, probablement à cause d'une densité moléculaire supérieure. Globalement, ces valeurs démontrent que les monocouches de MGDG et DGDG conservent une élasticité considérable, même à des pressions de surface assez élevées.

Finalement, nous avons examiné la stabilité des monocouches au fil du temps : les monocouches ont été comprimées à une pression de 20 mN/m , puis cette pression a été maintenue constante grâce au système d'asservissement utilisé lors des transferts. Dans toutes les conditions expérimentales testées, on observe une diminution de la surface entre les deux barrières au cours du temps (Fig. 4).

IV. Résultats

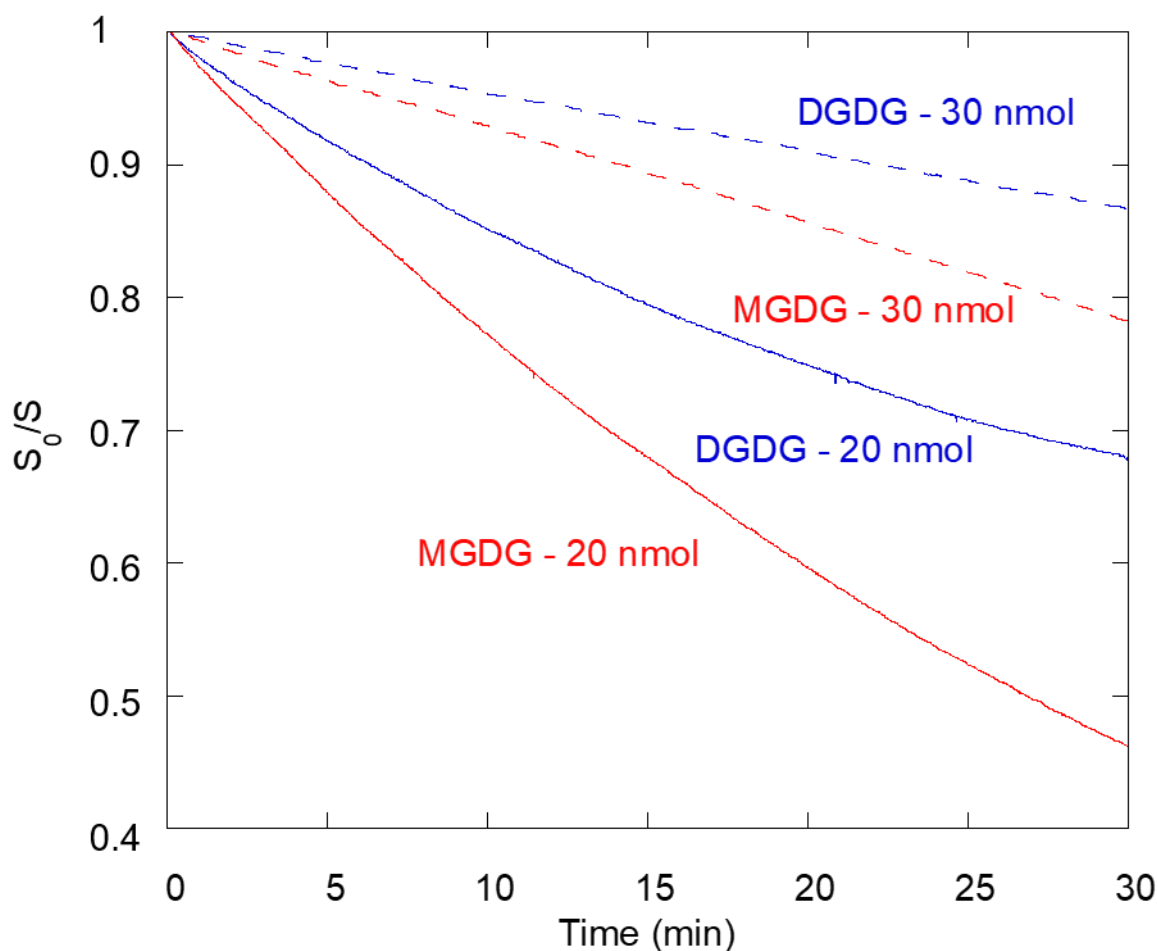


Figure 4. Diminution au cours du temps des surfaces occupées par les monocouches maintenues à une pression de surface de 20 mN/m. Les surfaces S sont normalisées par rapport à la surface initiale (S_0) au début du contrôle de la pression (MGDG en rouge et DGDG en bleu, les monocouches étant obtenues par étalement de 20 nmol (courbes en traits pleins) et de 30 nmol (courbes en traits pointillés).

Cette diminution traduit au minimum une réorganisation des molécules dans le plan de la monocouche, et plus probablement d'autres mécanismes réduisant la densité moléculaire à l'interface. L'amplitude de cette décroissance varie selon le type de monocouche : à quantité déposée égale, le DGDG est plus stable que le MGDG. La stabilité des deux types de monocouches est améliorée par l'accroissement du nombre de molécules étalées initialement.

IV. Résultats

Les monocouches ont finalement été transférées sur des substrats de mica, à diverses pressions de surface. Les films de Langmuir-Blodgett résultant de ces transferts ont été observés en microscopie à force atomique (AFM).

Dans les deux cas, MGDG et DGDG, les images des films de Langmuir-Blodgett transférés à $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sont généralement uniformes, ce qui concorde avec la présence d'une phase exclusivement de type liquide-expansé pour ces lipides (résultats non illustrés). Néanmoins, on observe aussi des disparités dans les films obtenus sous cette pression minimale, et elles sont encore plus marquées lorsque la pression appliquée est plus importante. Les Figures 5 et 6 présentent des exemples typiques.

Concernant le DGDG (Fig. 5), les images de topographie mettent en évidence l'existence d'agrégats aux formes irrégulières. Les profils de hauteur relevés dans ces régions indiquent qu'ils sont plus élevés que le niveau de la phase environnante, avec des épaisseurs variant entre 2 et 4 nm.

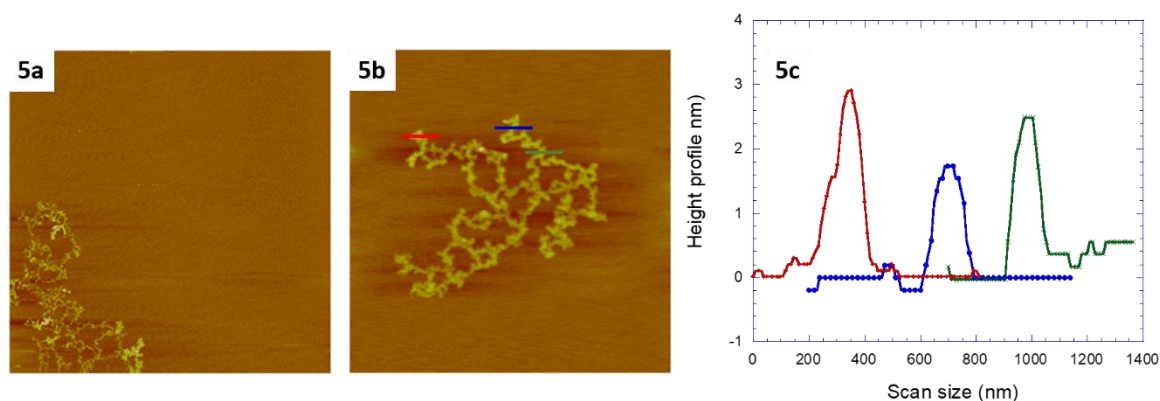


Figure 5. Images AFM de hauteur de films de Langmuir Blodgett de DGDG transférés à a) $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($10 \times 10 \mu\text{m}$) et b) $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($5 \times 5 \mu\text{m}$) ; c) profils de hauteur mesurés le long des segments de droite tracés sur l'image b).

Pour le MGDG, on constate aussi la présence d'agrégats, avec des épaisseurs qui se situent dans la même gamme. Cependant, ces zones couvrent une superficie proportionnellement plus grande (Fig. 6), suggérant un phénomène plus prononcé que pour le DGDG. L'examen des différences entre les

IV. Résultats

images topographiques et les images de phase (zones délimitées en jaune sur les Fig. 6d-e) démontre également une diversité dans l'organisation moléculaire des zones empilées. En effet, la source du contraste varie en fonction du mode d'imagerie utilisé : contraste dû à des différences de hauteur dans les images de hauteur (ou topographie), contraste dû à des propriétés mécaniques différentes dans les images de phase.

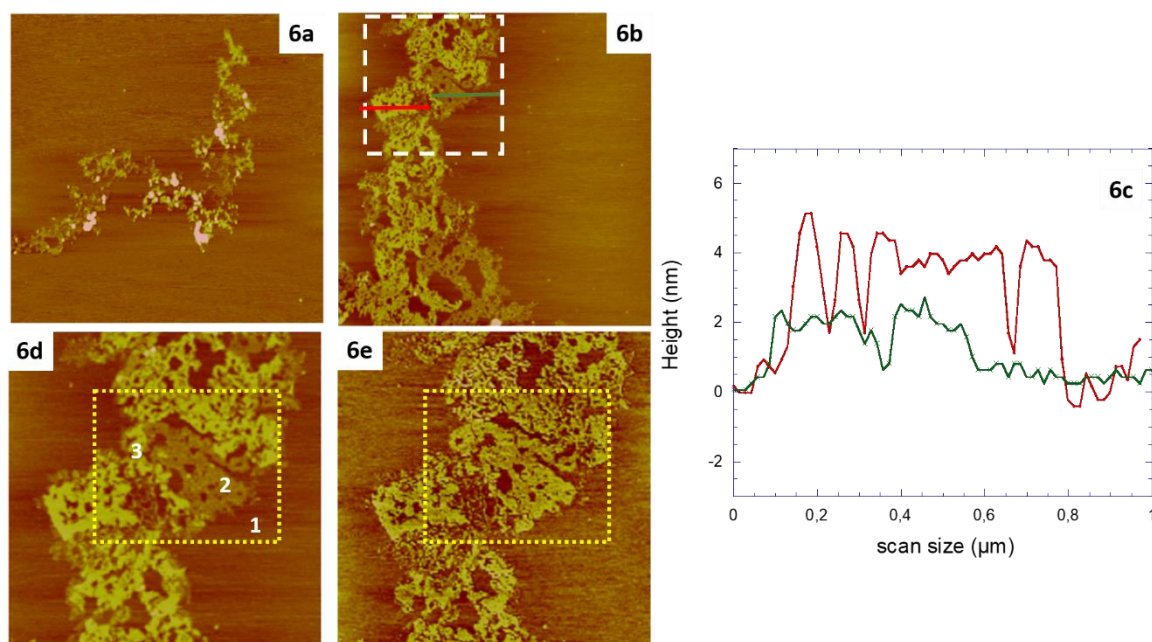


Figure 6. a) et b) Images AFM de hauteur de films de Langmuir Blodgett de MGDG transférés à 25 mN.m^{-1} ($5 \times 5 \mu\text{m}$) ; c) profils de hauteur mesurés le long des segments de droite tracés sur l'image b) ; d) image de hauteur ($2,5 \times 2,5 \mu\text{m}$) et e) image de phase correspondante ($2,5 \times 2,5 \mu\text{m}$) obtenues par zoom sur la zone délimitée en blanc dans l'image b et d). Dans la zone délimitée en jaune, les chiffres indiquent le nombre probable de couches empilées localement.

Dans la zone encadrée en jaune dans la Fig. 6d, le mica est probablement recouvert de couches lipidiques en nombre variable entre 1 et 3, les épaisseurs étant compatibles avec des multiples de la longueur estimée d'une molécule de MGDG ou DGDG, autour de 2,2 nm (Phan *et al.*, 2020) et générant des couleurs allant du brun (une couche au contact direct du mica) au jaune clair (trois

IV. Résultats

couches supposées). Cependant, la valeur du signal de phase reste homogène dans les régions comportant deux ou trois couches, et reste supérieure à celle de la phase environnante. Une telle observation suggère l'existence de propriétés mécaniques différentes, reflétant vraisemblablement des organisations moléculaires hétérogènes (Grauby-Heywang *et al.*, 2016).

4. Discussion

Nos résultats montrent que le MGDG et le DGDG, bien que fortement insaturés, ont la capacité de créer des monocouches. Néanmoins, plusieurs facteurs suggèrent que ces monocouches ne sont pas entièrement stables. Les isothermes π -A que l'on obtient à partir de monocouches composées d'un nombre restreint de molécules présentent des aires moléculaires moyennes plutôt basses sous de fortes pressions de surface, en tenant compte de leur structure chimique. Par ailleurs, les valeurs du module de compression C_s^{-1} restent également basses et ne dépassent pas une valeur de $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ dans le cas du MGDG et $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ dans le cas du DGDG, ce qui indique que les monocouches conservent une grande élasticité pendant la compression.

Pour évaluer et comparer la stabilité des monocouches, une approche efficace consiste à asservir leur pression et observer l'évolution de leur surface au fil du temps dans diverses conditions expérimentales (nature du lipide, quantité de molécules étalées). Dans tous les cas, on constate une diminution de la surface relative S/S_0 au fil du temps. L'analyse de ces graphes permet donc d'identifier une possible désorption des molécules, induite par la compression constante de la monocouche, ou la dégradation des molécules, cette dernière pouvant également provoquer une désorption. En effet, des courbes analogues ont été publiées pour des phospholipides polyinsaturés exposés à l'air ambiant, au contact duquel ils s'oxydent graduellement (Liljeblad *et al.*, 2010 ; Heffern *et al.*, 2013). Liljeblad et ses collaborateurs ont aussi rapporté une augmentation temporaire du ratio

IV. Résultats

S/S₀ au début de l'expérience, attribuée à une augmentation transitoire des espèces chimiques présentes dans le plan de la monocouche due au clivage des lipides. Nous n'observons pas cette augmentation transitoire, mais un processus similaire pourrait expliquer que la pression de surface augmente légèrement entre la fin de l'étalement et le début de la compression, 20 minutes plus tard.

Tout comme les phospholipides polyinsaturés, les MGDG et DGDG analysés dans cette étude sont manifestement touchés par ce processus d'auto-oxydation, à cause de la présence de molécules oxydantes dans l'atmosphère, comme l'oxygène singulet ou l'ozone (Boisselier *et al.*, 2013). Toutefois, le rapport de la surface S/S₀ des monocouches varie différemment en fonction du type de lipide utilisé et du nombre de molécules déposées.

En premier lieu, pour une quantité comparable de molécules, la réduction est habituellement plus prononcée avec le MGDG, bien que les indices de double liaison (DBI) du MGDG et du DGDG soient proches, ce qui suggère une propension similaire à l'oxydation, au maximum légèrement plus élevée pour le MGDG.

En second lieu, une augmentation du nombre de molécules étalées réduit de façon significative l'amplitude de la diminution de S/S₀. Il est ardu de justifier un tel effet si l'on considère l'oxydation comme le seul processus impliqué : l'oxydation pourrait être moins performante en raison d'une plus grande cohésion entre les molécules, bien que dans ces monocouches hautement fluides, les doubles liaisons demeurent probablement largement accessibles aux agents oxydants.

À ce stade, les images AFM des films de Langmuir-Blodgett fournissent des renseignements complémentaires. Tout d'abord, elles démontrent la présence d'une phase homogène prédominante, ce qui est en concordance avec la phase liquide expansé des lipides, observée dans les isothermes π -A. On ne constate aucune dégradation par oxydation sur ces surfaces uniformes. En effet, nous avons démontré dans une étude antérieure concernant le POPC (un phospholipide également insaturé, mais à un degré moindre que le MGDG et le DGDG) que de petits domaines apparaissaient

IV. Résultats

dans les jours suivant le transfert. Ces domaines avaient été attribués à l'oxydation (car n'apparaissant pas si les films étaient conservés sous vide avant d'être observés en AFM). On a également noté de tels domaines dans le cadre des films Langmuir-Blodgett de MGDG (données non dévoilées), mais uniquement lorsqu'ils ont été observés quelques jours après le transfert.

D'autre part, les images AFM montrent aussi l'existence de « couches » plus épaisses que le niveau de la monocouche environnante, avec des épaisseurs variant entre 2 et 4 nm, correspondant à de la matière éjectée hors de la monocouche. Selon des mesures de réflectivité X et neutronique effectuées sur des monocouches de MGDG saturé et de DGDG insaturé, la longueur moléculaire est approximativement de 2,2 nm (Phan *et al.*, 2020). Il est donc possible que ces multicouches contiennent des molécules de MGDG et DGDG intactes, même si la présence de lipides oxydés dans ces structures ne peut être totalement exclue.

Par ailleurs, l'éjection semble davantage restreinte pour le DGDG en termes de surface couverte, tandis que la susceptibilité à l'oxydation des deux lipides est probablement comparable, comme l'indiquent leurs indices de double liaison (DBI).

Au final, l'ensemble des données indique deux mécanismes potentiels pour expliquer l'instabilité des monocouches. Dans ces monocouches, l'oxydation a lieu et provoque une réduction de la surface relative de la monocouche via des réorganisations moléculaires au sein de la monocouche et par la libération de lipides dégradés, devenant donc plus polaires (chaînes plus courtes).

Toutefois, il est probable qu'un autre mécanisme soit à l'œuvre dans le cas du MGDG, favorisant son éjection et suggérant un comportement distinct du MGDG par rapport au DGDG. A ce stade il est important de noter que les lipides DGDG et MGDG insaturés n'ont pas les mêmes propriétés en termes de forme et de phase adoptée. On considère que le DGDG est un lipide de structure cylindrique capable de s'organiser en phases lamellaires. Cette organisation régulière est supposée induire une tolérance thermique chez les plantes en raison de son aptitude à stabiliser les bicouches

IV. Résultats

(Li-Besson *et al.*, 2016). En revanche, le MGDG est classé parmi les lipides ne formant pas de bicouche du fait de sa structure conique, cette structure étant supposée capable de provoquer la courbure d'un système membranaire (Israelachvili *et al.*, 1980 ; Gruner, S.M., 1985). On note ainsi spécifiquement la présence de lipides « non-bicouches » dans les membranes qui participent à la conversion d'énergie, comme celles des thylakoïdes ou les membranes internes mitochondriales, ces systèmes partageant la propriété de créer des réseaux structuraux flexibles. Plusieurs modèles ont été suggérés pour les expliquer, soulignant l'importance des lipides « non-bicouches » en matière de plasticité, leur potentielle séparation des membranes et leur rôle central dans la gestion du ratio lipides/protéines (Garab *et al.*, 2022).

Les structures « non-bicouches » incluent la phase hexagonale inversée HII, ainsi que des micelles inversées et des *stalks* (tiges) (Fig. 7a). Ces derniers sont perçus comme des états transitoires au cours de la transition de la phase $L\alpha$ vers la phase HII (Jouet, 2013 ; Garab *et al.*, 2022 ; Li, Gasanoff, 2023 ; Hryc *et al.*, 2023).

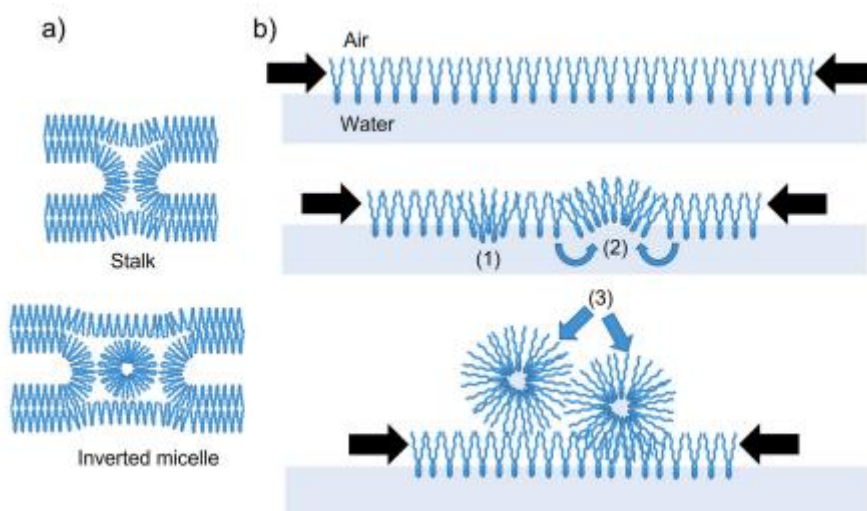


Figure 7. a) organisation des lipides « non-bicouches » en *stalks* (tiges) et en micelles inversées ; b) mécanisme possible conduisant à l'éjection du MGDG sous compression : (1) rassemblement des molécules, tous les groupes monogalactosyle n'étant pas situés au même niveau comme montré par

IV. Résultats

Bottier, 2008 ; (2) début de l'éjection des molécules ; (3) état final, avec des surfaces exposées indiquées par des flèches, présentant les mêmes propriétés mécaniques mais des hauteurs différentes.

Différentes méthodes expérimentales, dont la RMN et la diffraction des rayons X, ont mis en évidence cette différence significative entre le MGDG et le DGDG (Brentel et al., 1985 ; Bottier *et al.*, 2007 ; Bottier *et al.*, 2008). Des observations comparables ont été notées concernant des glycolipides insaturés, où les résidus galactosyle étaient substitués par des résidus glucosyle (Lindblom *et al.*, 1986). La présence de particules lipidiques dans des dispersions aqueuses de MGDG a aussi été mise en évidence par la microscopie électronique en cryodécapage, ces particules étant identifiées comme des micelles inversées insérées dans la phase lamellaire (Sen *et al.*, 1982). Ces informations expérimentales sont également corroborées par diverses expériences de dynamique moléculaire. Par exemple, Bratek et son équipe ont élaboré un modèle atomique prédictif des paramètres structuraux du MGDG insaturé en phase hexagonale (Bratek *et al.*, 2019). En outre, Hryc et son équipe ont détaillé dans une étude la conversion spontanée de bicouches parallèles composées de MGDG insaturé en structures non lamellaires qui créent un réseau de « canaux à eau », présentant une organisation moléculaire comparable à celle des micelles inversées (Hryc *et al.*, 2023). Van Eerden et son équipe ont examiné des systèmes encore plus compliqués, composés de mélanges de lipides en utilisant une méthode alliant des simulations à grande échelle et atomiques. Leur étude des sections transversales dans des membranes de thylakoïdes a démontré la capacité des lipides polyinsaturés à se replier vers l'interface ainsi que la tendance des membranes thylakoïdes à former les tiges évoquées précédemment (Van Eerden *et al.*, 2015).

Dans notre dispositif expérimental reposant sur une seule monocouche lipidique, la réalisation complète de telles structures « non-bicouches » n'est probablement pas envisageable. Toutefois, les recherches antérieures soutiennent l'hypothèse que les systèmes basés sur le MGDG créent des structures tridimensionnelles souples et plastiques. À l'interface air-eau, la compression pourrait

IV. Résultats

faciliter le réarrangement des molécules en dehors du plan de la monocouche (Fig. 7b), en stimulant la création de liaisons hydrogène galactose-galactose, qu'elles soient directes ou indirectes, ces dernières étant médiées par une molécule d'eau (Bratek *et al.*, 2019).

Une telle interaction pourrait aussi être facilitée si le nombre de molécules déposées est important : les profils de densité électronique obtenus grâce à la diffraction des rayons X sur des phases hexagonales de MGDG indiquent effectivement que les groupes monogalactosyle ne sont pas tous situés au même niveau, ce qui entraîne une rugosité de surface estimée à 3,6 Å (Bottier *et al.*, 2008). Malheureusement, cette rugosité se situe dans le bruit des mesures en AFM. Cependant, si une telle structure se formait à l'interface air-eau (Fig. 7b), elle pourrait représenter la première phase du processus qui conduit à la création de structures tridimensionnelles observées dans les films de Langmuir-Blodgett. Ces dernières présentent des caractéristiques mécaniques variables en raison de leur hétérogénéité structurale et de la présence de produits oxydés (Grauby-Heywang *et al.*, 2016). Dans le cas du DGDG, dont la configuration cylindrique encourage une structure plus ordonnée, une organisation « non-bicouche » n'est pas supposée se constituer.

IV. Résultats

III. Résultats

III.1. Caractérisation du modèle biologique par microscopie optique

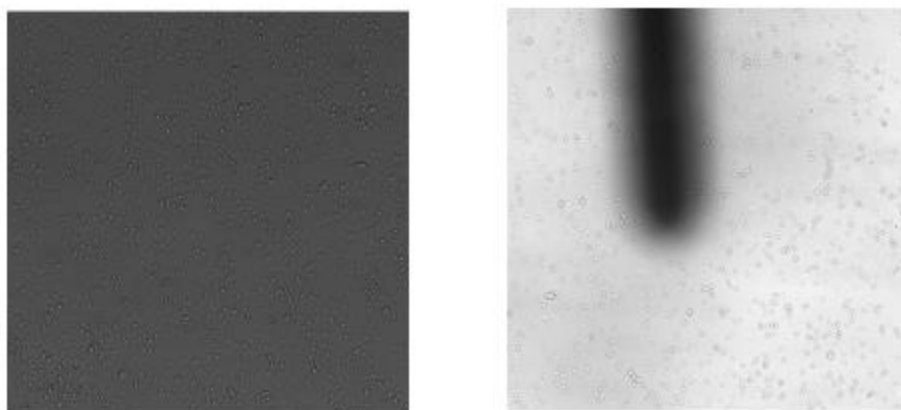


Figure 7 – La picoalgue *Ostreococcus tauri* par microscopie optique (MO) (S. Benamara, 2021)

Les cellules de la pico-algue *Ostreococcus tauri* cultivées dans des conditions standard ont pu être observées grâce à la microscopie optique (MO). La Figure 7 présente deux micrographies réalisées avec le même grossissement : l'une en lumière transmise, l'autre en contraste rehaussé.

On observe les cellules sous la forme de petites structures sphériques, dont le diamètre est inférieur à 2 μm , dispersées de façon uniforme dans le champ visuel. Leur petite taille et leur morphologie simple correspondent aux traits décrits pour cette espèce, reconnue comme la plus petite eucaryote photosynthétique connue.

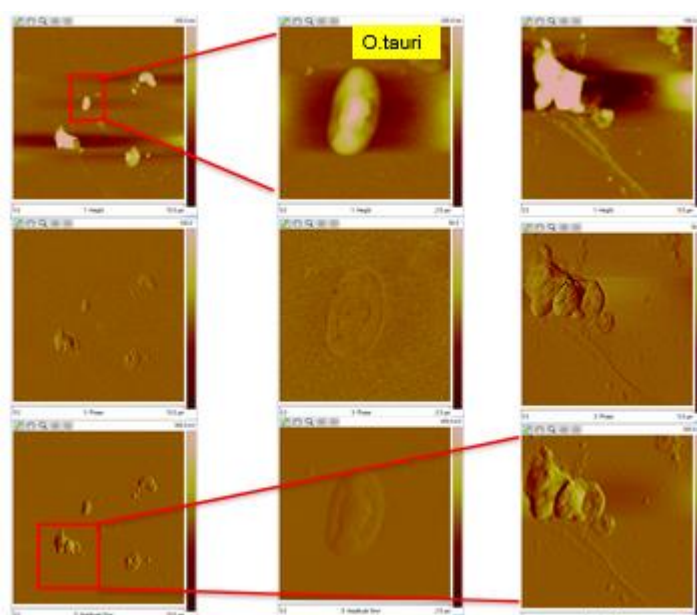
L'utilisation d'un contraste prononcé facilite l'observation des contours des cellules et souligne la présence de structures internes diffusées, qui semblent correspondre au chloroplaste unique prenant en charge une grande portion du volume cellulaire. Demir, I., Guiraud, P., Formosa-Dague, C. (2021)

IV. Résultats

Aucune agrégation notable n'a été observée, ce qui indique une bonne dispersibilité des cellules dans le milieu de culture et une **viabilité** satisfaisante avant les analyses biophysiques. La zone sombre visible sur l'une des micrographies pourrait correspondre à une bulle d'air ou à une particule étrangère, sans impact important sur l'interprétation globale. **Mišić Radić, T., Vukosav, P., Čačković, A., & Dulebo, A. (2023)**

La MO confirme la présence et la répartition appropriée des cellules d'*O. tauri*, tout en offrant des données morphologiques en accord avec ce qui est prévu pour cette espèce.

III.2. Caractérisation du modèle biologique par AFM



IV. Résultats

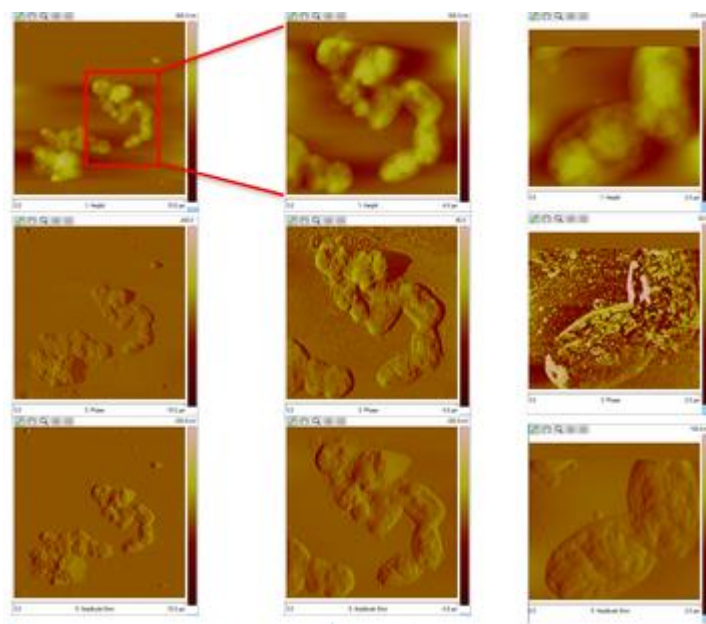


Figure 8 – Images AFM de *Ostreococcus tauri* [Titre provisoire – à compléter par l'auteure]

Les morphologies observées à l'air au moyen de l'AFM varient en fonction des zones examinées.

Les cellules de *O. tauri* sont généralement sphériques ou ovoïdes, avec un diamètre variant entre 0,8 et 1,5 μm , ce qui correspond à leurs dimensions connues. Dans certaines régions (Figure 8), on observe des cellules organisées en amas denses ou en structures étendues, qui pourraient être des cellules en phase de division ou des agrégats cellulaires associés au dépôt.

Les images de phase mettent en évidence des contrastes marqués entre les cellules et le substrat, attestant d'une adhésion partielle et d'une surface plutôt uniforme. Certaines cellules affichent une surface lisse, indiquant une bonne intégrité de la membrane, alors que d'autres exhibent une texture plus granuleuse, résultant soit d'une déformation liée au dessèchement, soit de l'existence de structures internes à la membrane. Courties, C., Perasso, R., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Gouy, M., Guillou, L., Troussellier, M. (1998)

IV. Résultats

Dans le second lot d'images, on peut identifier clairement plusieurs cellules isolées et les attribuer à *O. tauri* en raison de leur morphologie régulière et de leur taille réduite. Il est possible que les zones plus irrégulières ou contenant des débris soient liées aux résidus de milieu de culture ou de biofilm bactérien, ce qui est cohérent avec les données recueillies par microscopie optique démontrant leur coexistence avec des bactéries.

L'examen général des images révèle que :

- Après leur préparation, les cellules maintiennent leur forme et leur intégrité.
- La densité du dépôt est liée aux artefacts topographiques (zones de rupture, amas).
- La méthode AFM offre la possibilité d'analyser la morphologie et l'état de surface des picoalgues avec une résolution à l'échelle du nanomètre.

Ces résultats illustrent la possibilité d'utiliser l'imagerie AFM pour examiner les structures subcellulaires et l'interaction entre la cellule et le substrat chez *O. tauri*. Gonçalves, A. L., Ferreira, C., Loureiro, J. A., et al. **(2015)**

III.3. Comparaison des résultats obtenus par la microscopie optique (MO) et la microscopie à force atomique (AFM) sur *Ostreococcus tauri*.

L'examen combiné des images issues de la microscopie optique (MO) et de la microscopie à force atomique (AFM) offre une perspective d'ensemble, à divers niveaux d'échelle, sur la morphologie et le statut structurel des cellules d'*Ostreococcus tauri*.

IV. Résultats

III.3.1. Observations générales à l'aide du microscope optique

Les observations en microscopie électronique révèlent des cellules légèrement ovales et sphériques, de taille uniforme (approximativement 1 μm), qui sont isolées ou faiblement groupées selon les échantillons. Les cellules affichent une apparence claire et uniforme, indiquant une viabilité satisfaisante.

La microscopie optique offre aussi la possibilité d'observer la coexistence avec des bactéries, attestant du caractère symbiotique de l'environnement microbien d'O. tauri.

III.3.2. Observations minutieuses en microscopie à force atomique

L'AFM, grâce à sa capacité de résolution nanométrique, enrichit les observations optiques en offrant des données topographiques et physiques concernant la surface cellulaire.

Les cellules observées en AFM, de forme circulaire à ovale, présentent des dimensions similaires à celles établies par la microscopie optique.

Les images de phase mettent en évidence des différences de rigidité et de viscosité entre la cellule et le substrat, ce qui illustre la distinction entre la paroi algale et le support. Les surfaces cellulaires examinées sont généralement lisses, bien que certaines affichent une texture granuleuse, qui pourrait être liée à des structures internes (comme les chloroplastes ou les organites), ou à des restes de membrane lésée suite à un dessèchement.

IV. Résultats

Par conséquent, la microscopie optique offre une perspective générale rapide de la population cellulaire et de son agencement, alors que l'AFM propose une étude détaillée de la morphologie, de la rugosité et de l'intégrité de la surface cellulaire.

✓ Les deux méthodes se rejoignent pour démontrer que :

Les cellules d'O. tauri maintiennent leur configuration sphérique.

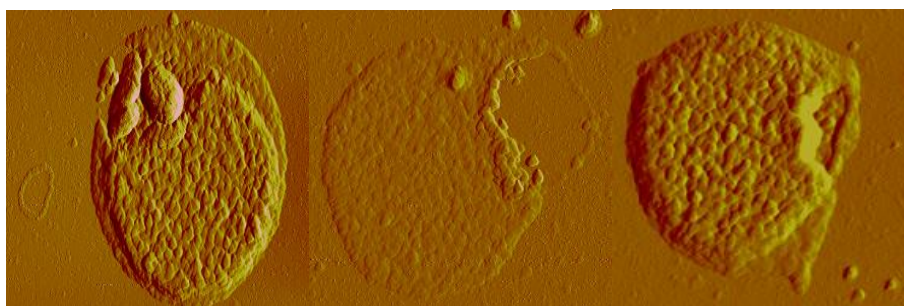
Les deux méthodes révèlent une véritable interaction biologique plutôt qu'un artefact de préparation, comme en témoignent la coexistence avec des bactéries et la présence de résidus.

L'analyse comparative des deux techniques souligne leur caractère complémentaire : la MO est efficace pour identifier et décrire les cellules au niveau microscopique, tandis que l'AFM fournit des données précises sur la surface et le statut physique des cellules. Degraeve-Guilbault, C., Bréhélin, C., Corellou, F., Plant Physiology (2017)

L'application simultanée de ces deux méthodes fournit une description multi-niveau pertinente d'O. tauri, cruciale pour l'analyse de sa morphologie, de ses interactions avec les bactéries qui lui sont associées et de sa réaction face aux conditions environnementales. (Mišić Radić 2023, Demir-Yilmaz 2021.)

III.4. Présentation des résultats issus de l'expérience C :18 (ot5)

Figure 9 – [Titre provisoire – à compléter par l'auteure]



IV. Résultats

Figure 10 – Images AFM de l'échantillon Ot5 (mode Tapping, air) (S. Benamara, 2022)

Plusieurs zones caractéristiques de l'*Ostreococcus tauri* ont été identifiées grâce aux analyses AFM effectuées sur l'échantillon Ot5, en mode Tapping à l'air.

Des cellules isolées de morphologie ronde, d'un diamètre moyen de 2,2 à 2,5 μm et d'une hauteur de 50 à 60 nm sont représentées par les images topographiques. Cette forme coccus standard est conforme à la morphologie mentionnée dans les publications pour *O. tauri* (Courties et al., 1994 ; Henderson et al., 2007).

Les cellules examinées affichent une surface subtilement structurée, par moments légèrement ridée, ce qui témoigne d'une topographie complexe des membranes. Cette texture pourrait être associée à l'existence d'éléments internes de nature membranaire, comme les thylakoïdes, ou à des déformations de surface dues au dessèchement de l'échantillon.

Dans certaines régions, la membrane cellulaire semble plate ou déprimée, indiquant une lyse partielle. Ce phénomène pourrait être dû à un stress mécanique ou à une carence en lipides, particulièrement l'absence d'acide gras C18, réputé pour garantir la rigidité et l'adhérence de la membrane (Degraeve-Guilbault et al., 2017).

III.4.1. Analyse morphologique et biophysique

L'analyse AFM offre la possibilité de recueillir des données topographiques à l'échelle du nanomètre.

IV. Résultats

Les cellules d'*O. tauri* observées montrent une surface uniforme, bien que quelque peu irrégulière, indiquant une organisation membranaire à la fois stable et flexible. Cette microalgue, connue pour sa membrane souple, renferme une grande quantité de glycolipides (MGDG et DGDG), qui sont indispensables à la souplesse des membranes chloroplastiques (Corellou et al., 2017 ; Degraeve-Guilbault et al., 2017).

Le manque de C :18 (acide stéarique) dans cet échantillon pourrait justifier la réduction de la rigidité et la déformation partielle des contours cellulaires. Effectivement, les acides gras saturés de longue chaîne contribuent à la solidité et à la cohésion de la membrane (Mišić Radić et al., 2023). Leur manque peut mener à une membrane plus fluide et susceptible de se rompre plus facilement, ce qui est en accord avec les régions lisées notées sur les images AFM.

L'analyse montre une rugosité faible, avec une surface plutôt uniforme un indice de membrane intacte. Ce profil morphologique est comparable à celui observé chez d'autres microalgues chlorophycées analysées par AFM, telles que *Chlorella vulgaris* ou *Nannochloropsis* sp., où les membranes non endommagées montrent une rugosité inférieure à 100 nm (Demir-Yilmaz et al., 2021).

La taille minimaliste et simplifiée de *O. tauri*, reconnue comme le plus petit eucaryote photosynthétique libre (d'un diamètre de 1 à 2 μm) (Henderson et al., 2007), est en accord avec la topographie révélée par l'AFM.

Selon les études de Degraeve-Guilbault et al. (2017), la composition lipidique de cette algue est modifiée par les conditions nutritives, ce qui a un impact sur la fermeté et la stabilité des membranes. Les observations AFM de cette étude confirment cette sensibilité : les cellules dépourvues de C :18 présentent une surface plus douce et inégale, indiquant une diminution de la résistance de la membrane et son mécanisme

IV. Résultats

D'autres parts, la morphologie en forme de coccus, l'existence de membranes lisses et de structures internes visibles indiquent que les cellules d'*O. tauri* conservent une intégrité membranaire caractéristique des cellules en développement, alors que certaines images montrent des cellules lysées, possiblement à la fin de leur cycle ou touchées par la préparation à l'air.

On déduit que les résultats coïncident avec celles de Mišić Radić et al. (2023) ainsi que de Demir-Yilmaz et al. (2021), qui mettent en avant la réactivité des microalgues face aux conditions de séchage et l'apparition d'agrégats de surface observés en AFM.

Enfin, la texture régulière observée sur la surface pourrait aussi refléter une organisation lipidique particulière. Des études sur les films lipidiques de MGDG et DGDG (Degraeve-Guilbault, 2017) ont montré que ces lipides forment des domaines topographiques distincts à l'échelle nanométrique, comparables aux motifs observés sur la membrane d'*O. tauri*.

.

IV. Conclusion générale et Perspectives

Conclusion et perspectives

Cette recherche a été axée sur l'analyse biophysique et structurale des membranes thylakoïdales d'*Ostreococcus tauri*, ainsi que sur l'examen du comportement de leurs composants lipidiques majeurs, à savoir le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG). En combinant l'analyse par films de Langmuir-Blodgett et la microscopie à force atomique (AFM), ces recherches ont établi un lien entre les caractéristiques moléculaires des lipides isolés et la structure ainsi que la stabilité des membranes biologiques natives.

Les résultats de l'étude ont attesté que les membranes thylakoïdales d'*O. tauri* présentent une structure lipidique unique, dominée par des galactolipides hautement insaturés qui offrent aux membranes une souplesse remarquable et une capacité d'adaptation dynamique face aux pressions environnementales. Les recherches sur les monocouches ont démontré que le MGDG et le DGDG créent des films stables en phase liquide expansive, mais réagissent différemment sous compression.

Ainsi, le MGDG, de forme conique et non bilayère, tend à adopter des organisations instables et à subir une désorption moléculaire hors du plan, traduisant une tendance naturelle à la formation de structures non lamellaires. En revanche, le DGDG, de forme cylindrique, maintient une cohésion intermoléculaire plus forte, assurant la stabilité et la résistance mécanique des assemblages lipidiques. Ces résultats confirment le rôle complémentaire de ces deux galactolipides : le MGDG comme élément de flexibilité et de remodelage, et le DGDG comme facteur de stabilisation structurale des membranes thylakoïdales.

L'analyse AFM des cellules d'*O. tauri* a enrichi ces observations en mettant en évidence la forme sphérique et uniforme de cette picoalgue, dont les membranes affichent une texture

IV. Conclusion générale et Perspectives

délicate et uniforme, parfois légèrement modifiée localement. Ces constatations ont souligné un lien direct entre la composition en lipides et la structure morphologique des cellules, particulièrement en relation avec la présence ou l'absence d'acides gras saturés de type C18, indispensables à la rigidité membranaire. Les modifications repérées sur certaines cellules reflètent la réceptivité de la membrane aux pressions extérieures et attestent l'importance cruciale de la constitution lipidique dans la stabilité structurale.

D'un point de vue méthodologique, cette recherche a montré l'importance de l'association des méthodes Langmuir-Blodgett et d'AFM pour l'analyse à plusieurs échelles des membranes biologiques : la première offre une analyse détaillée des caractéristiques d'interfaces et des transitions de phase, alors que la seconde facilite une observation directe de la topographie membranaire au niveau nanométrique. Ainsi, l'approche intégrée mise au point dans cette étude sert d'outil solide pour l'analyse des lipides photosynthétiques et de leurs agencements biomimétiques.

Outre les résultats précis concernant *O. tauri*, ces études contribuent de manière plus générale à la compréhension des processus d'adaptation des membranes photosynthétiques face aux fluctuations environnementales. Ils étayent l'hypothèse que la proportion relative de MGDG et de DGDG régule la flexibilité membranaire, un prérequis indispensable à la stabilité des complexes photosystémiques et à l'efficacité des mécanismes de transformation d'énergie.

Les résultats obtenus laissent entrevoir plusieurs pistes de recherche prometteuses :

- ✓ Étude des interactions entre lipides et protéines : Il serait pertinent d'examiner les relations entre les galactolipides et les protéines intégrales des thylakoïdes (en particulier les complexes PSII et PSI) pour comprendre comment la dynamique des lipides affecte la stabilité et le fonctionnement de ces complexes photosynthétiques.

IV. Conclusion générale et Perspectives

Analyse de la réaction des membranes aux métaux et contaminants :

- ✓ En approfondissant le sujet des interactions entre les lipides et les xénobiotiques, des expériences pourront mesurer l'effet des métaux lourds (Cu, Cd, Zn) sur la structure et le fonctionnement des membranes de *O. tauri*. Ces recherches permettront de mieux saisir les processus de tolérance ou de stress oxydatif induits par les polluants.

Analyse des transitions de phase sous conditions variables :

- ✓ L'utilisation de méthodes supplémentaires (FTIR, SAXS, DSC) amènerait une caractérisation plus précise des transitions de phase et de la stabilité thermique des galactolipides dans divers environnements (température, pH, salinité).

Dynamique moléculaire et modélisation atomique :

- ✓ L'utilisation d'approches de simulation dynamique ou de modélisation atomique pourrait fournir une compréhension approfondie des interactions entre le MGDG, le

IV. Conclusion générale et Perspectives

DGDG et d'autres composants membranaires, ce qui permettrait d'établir un lien entre structure, souplesse et fonction.

Applications en biotechnologie et environnement :

- ✓ Les caractéristiques structurelles et d'auto-assemblage des galactolipides pourraient être mis à profit pour créer des nanomatériaux inspirés de la biologie, des capteurs membranaires, ou même pour la bioremédiation du fait de leur attraction aux ions métalliques.

Pour conclure, ce travail de recherche a permis d'approfondir notre compréhension du lien étroit entre la composition lipidique, l'architecture membranaire et les propriétés biophysiques chez *Ostreococcus tauri*, un modèle simplifié mais emblématique des eucaryotes photosynthétiques.

Les conclusions tirées mettent en lumière les principes essentiels de la flexibilité et de la stabilité membranaires, et préparent le terrain pour une investigation plus approfondie des processus d'adaptation des membranes biologiques à l'échelle moléculaire.

Cette expertise pointue constitue une avancée significative vers la création de matériaux bio-inspirés et de stratégies durables qui exploitent les propriétés uniques des lipides photosynthétiques.

V. Références Bibliographiques

Reference bibliographique

- Abida, H., Dolch, L.-J., Meï, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M.A., Finazzi, G., Bastien, O., Tirichine, L., Bowler, C., et al. (2015). Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* 167, 118–136.
- Ahmann, K., Heilmann, M., and Feussner, I. (2011). Identification of a Δ^4 -desaturase from the microalga *Ostreococcus lucimarinus*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 832–840.
- Allakhverdiev, S.I., Los, D.A., and Murata, N. (2009). Regulatory Roles in Photosynthesis of Unsaturated Fatty Acids in Membrane Lipids. In *Lipids in Photosynthesis*, H. Wada, and N. Murata, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 373–388.
- An, M., Mou, S., Zhang, X., Ye, N., Zheng, Z., Cao, S., Xu, D., Fan, X., Wang, Y., and Miao, J. (2013). Temperature regulates fatty acid desaturases at a transcriptional level and modulates the fatty acid profile in the Antarctic microalga *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Bioresour. Technol.* 134, 151–157.
- Andrews, J., and Mudd, J.B. (1985). Phosphatidylglycerol synthesis in pea chloroplasts: pathway and localization. *Plant Physiol.* 79, 259–265.

V. Références Bibliographiques

- Archibald, J. (2005). Jumping Genes and Shrinking Genomes – Probing the Evolution of Eukaryotic Photosynthesis with Genomics. IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life 57, 539–547.
- Armada, I., Hachero-Cruzado, I., Mazuelos, N., Ríos, J.L., Manchado, M., and Cañavate, J.P. (2013).
- Differences in betaine lipids and fatty acids between *Pseudoisochrysis paradoxa* VLP and *Diacronema*
- *vlkianum* VLP isolates (Haptophyta). Phytochemistry 95, 224–233.
- Awai, K., Maréchal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., and
- Joyard, J. (2001). Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants,
- differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in
- *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 10960–10965.
- Courties, C., Chrétiennot-Dinet, M.-J., et al. (1994). *Description and phylogeny of Ostreococcus tauri (Chlorophyta, Prasinophyceae)*. Journal of Phycology, 30, 844–854.
- Henderson, G. P., et al. (2007). *3D ultrastructure of Ostreococcus tauri by cryo-electron tomography*. PNAS, 104, 2409–2414.
- Degraeve-Guilbault, C., Bréhélin, C., Corellou, F., et al. (2017). *Glycerolipid characterization and nutrient-deprivation associated changes in the green picoalga O. tauri*. Plant Physiology, 173, 2060–2079.
- Mišić Radić, T., et al. (2023). *Insights into the Morphology and Surface Properties of Microalgae at the Nanoscale by AFM*. Water, 15(11), 1983.

V. Références Bibliographiques

- Demir-Yilmaz, I., Formosa-Dague, C., et al. (2021). *The contribution of AFM in microalgae studies*. Algal Research, 60, 102506.
- Benamor., Etude et optimisation de la bioaccumulation de magnésium dans les microalgues «
Chlorella vulgaris »,Thèse de l'Université de Versailles, 2015
- Bottier et coll., Galactosyl headgroup interactions control the molecular packing of wheat lipids in Langmuir films and in hydrated liquid-crystalline mesophases, Biochim. Biophys. Acta(2007) 1768, 1526
- Courties et coll., Smallest eukaryotic organism ,1994
- Derelle et coll., Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A,(2006) 103, 11647-11652
- Faye 2014 : N. R. Faye, Etude par microscopie à force atomique et par microscopie de fluorescence de l'interaction de nanoparticules de silice avec des films lipidiques plans, Thèse de l'Université de Bordeaux, 2014
- Garcia-Manyes et coll., Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM : A perspective, Biochim. Biophys. Acta (2010) 1798, 741
- Grauby-Heywang et coll., Influence of oxidized lipids on palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine organization, contribution of Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films Chem. Phys.Lipids (2016) 200, 74
- Hoyo et coll., Monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol role, physical states, applications and biomimetic monolayer films, Eur. Phys. J. E (2016) 39, 39

V. Références Bibliographiques

- Mathelié-Guinlet et coll., Silica nanoparticles-assisted electrochemical biosensor for the rapid, sensitive and specific detection of *Escherichia coli* Sensors Actuators B (2019), 292, 314
- Perissonotto et coll., GM1 Ganglioside role in the interaction of Alpha-synuclein with lipid membranes : Morphology and structure, Biophys Chem. (2019) 255, 106272
- Phan et coll., X-ray and neutron reflectivity studies of styrene-maleic acid copolymer interactions with galactolipid-containing monolayers, Langmuir (2020) 36, 3970
- Hayward, A., & Stone, G. N. (2006). Comparative phylogeography across two trophic levels: the oak gall wasp *Andricus kollari* and its chalcid parasitoid *Megastigmus stigmatizans*. *Molecular Ecology*, 15(2), 479-489. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02811.x
- HÖGLUND, S. (2014). Timing of growth determines fitness and performance of a galling insect on willow. *Ecological Entomology*, 39(2), 159-167.
- Hood, G. R., Zhang, L., Topper, L., Brandão-Dias, P. F., Del Pino, G. A., Comerford, M. S., & Egan, S. P. (2018). 'Closing the life cycle' of *Andricus quercuslanigera* (Hymenoptera: Cynipidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 111(3), 103-113. doi: 10.1093/aesa/say005
- Hosseinzadeh, A. (2012). Species richness and true diversity of cynipid galling-wasps community in oak forests of West-Azerbaijan Province (Iran). *African Journal of Biotechnology*, 11(36), 8912-8919.
- Singer, S., Chen, G., Mietkiewska, E., Tomasi, P., Jayawardhane, K., M Dyer, J., and J Weselake, R.
- (2016). *Arabidopsis* GPAT9 contributes to synthesis of intracellular glycerolipids but not surface lipids.
- J. Exp. Bot. 67.

V. Références Bibliographiques

- Six, C., Sherrard, R., Lionard, M., Roy, S., and Campbell, D.A. (2009). Photosystem II and Pigment
- Dynamics among Ecotypes of the Green Alga *Ostreococcus*. *PLANT Physiol.* 151, 379–390.
- Smith, M.A., Dauk, M., Ramadan, H., Yang, H., Seamons, L.E., Haslam, R.P., Beaudoin, F., Ramirez-
- Erosa, I., and Forseille, L. (2013). Involvement of Arabidopsis ACYL-COENZYME A
- DESATURASE-LIKE2 (At2g31360) in the Biosynthesis of the Very-Long-Chain Monounsaturated
- Fatty Acid Components of Membrane Lipids. *PLANT Physiol.* 161, 81–96.
- Somerville, C., and Browse, J. (1991). Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science* 252,
- 80–87.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J., and Ohlrogge, J. (2000). Lipids. In *Biochemistry and Molecular*
- *Biology of Plants*, (B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones eds (Rockville, MD : American
- Society of Plant Physiologists), pp. 456–526.
- Song, L.-Y., Lu, W.-X., Hu, J., Yin, W.-B., Chen, Y.-H., Wang, B.-L., Wang, R.R.-C., and Hu, Z.-M.
- (2013). The role of C-terminal amino acid residues of a $\Delta 6$ -fatty acid desaturase from blackcurrant.
- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 675–679.
- Song, L.-Y., Zhang, Y., Li, S.-F., Hu, J., Yin, W.-B., Chen, Y.-H., Hao, S.-T., Wang, B.-L., Wang, R.R.-

V. Références Bibliographiques

- C., and Hu, Z.-M. (2014). Identification of the substrate recognition region in the $\Delta 6$ -fatty acid and $\Delta 8$ -
- sphingolipid desaturase by fusion mutagenesis. *Planta* 239, 753–763.
- Sperling, P., Ternes, P., Zank, T.K., and Heinz, E. (2003). The evolution of desaturases. *Prostaglandins*
- Leukot. Essent. Fatty Acids 68, 73–95.
- Sprecher, H. (2000). Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*
- 1486, 219–231.
- Starikov, A.Y., Userbaeva, A.A., Lapina, S.S., Mironov, K.S., Maslova, I.P., Pchelkin, V.P., Zayadan,
- B.K., Sinetova, M.A., and Los, D.A. (2017). Substrate specificity of acyl-lipid $\Delta 9$ -desaturase from
- *Prochlorothrix hollandica* cyanobacterium producing myristoleic acid. *Russ. J. Plant Physiol.* 64, 560–
- 565.
- Stephens, E., Wolf, J., Oey, M., Zhang, E., Hankamer, B., and Ross, I.L. (2015). *Genetic Engineering*
- for Microalgae Strain Improvement in Relation to Biocrude Production Systems. In *Biomass and*
- *Biofuels from Microalgae*, N.R. Moheimani, M.P. McHenry, K. de Boer, and P.A. Bahri, eds. (Cham:
- Springer International Publishing), pp. 191–249.
- Strobel, C., Jahreis, G., and Kuhnt, K. (2012). Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish and fish products. *Lipids Health Dis.* 11, 144.

V. Références Bibliographiques

- Stymne, S., and Stobart, A.K. (1984). Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower
- (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. *Biochem. J.* 223, 305–314.
- Stymne, S., and Stobart, A.K. (1986). Biosynthesis of γ -linolenic acid in cotyledons and microsomal
- preparations of the developing seeds of common borage (*Borago officinalis*). *Biochem. J.* 240, 385–393
- Tardif, M., Atteia, A., Specht, M., Cogne, G., Rolland, N., Brugière, S., Hippler, M., Ferro, M., Bruley,
- C., Peltier, G., et al. (2012). PredAlgo: A New Subcellular Localization Prediction Tool Dedicated to
- Green Algae. *Mol. Biol. Evol.* 29, 3625–3639.
- Tasseva, G., Richard, L., and Zachowski, A. (2004). Regulation of
- phosphatidylcholine biosynthesis
- under salt stress involves choline kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 566, 115–120.
- Tatsuzawa, H., and Takizawa, E. (1995). Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*.
- *Phytochemistry* 40, 397–400.
- Tavares, S., Grotkjaer, T., Obsen, T., Haslam, R.P., Napier, J.A., and Gunnarsson, N. (2011). Metabolic
- Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Production of Eicosapentaenoic Acid, Using a Novel 5-
- Desaturase from *Paramecium tetraurelia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1854–1861.

V. Références Bibliographiques

- Teoh, M.-L., Chu, W.-L., Marchant, H., and Phang, S.-M. (2004). Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *J. Appl. Phycol.* 16, 421–430.
- Thompson, G.A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 17–45.
- Thorlby, G., Fourrier, N., and Warren, G. (2004). The SENSITIVE TO FREEZING2 Gene, Required for Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana*, Encodes a β -Glucosidase. *Plant Cell* 16, 2192–2203.
- Tikku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J., and Cossins, A.R. (1996). Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815–818.
- Tirichine, L., and Bowler, C. (2011). Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth: Decoding algal genomes. *Plant J.* 66, 45–57.
- To, A., Joubès, J., Barthole, G., Lécureuil, A., Scagnelli, A., Jasinski, S., Lepiniec, L., and Baud, S. (2012). WRINKLED Transcription Factors Orchestrate Tissue-Specific Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in *Arabidopsis*[W]. *Plant Cell* 24, 5007–5023.

V. Références Bibliographiques

- Tocher, D.R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.*41, 717–732.
- Tonon, T., Sayanova, O., Michaelson, L.V., Qing, R., Harvey, D., Larson, T.R., Li, Y., Napier, J.A., and Graham, I.A. (2005). Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana*: Microalgal front-end desaturases. *FEBS J.* 272, 3401–3412.
- Torres-Franklin, M.-L., Gigon, A., de Melo, D.F., Zuily-Fodil, Y., and Pham-Thi, A.-T. (2007). Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiol. Plant.* 0, 070607052959001–
- Zauner, S., Jochum, W., Bigorowski, T., and Benning, C. (2012). A Cytochrome b5-Containing Plastid-located Fatty Acid Desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 11, 856–863.
- Zhang, M., Fan, J., Taylor, D.C., and Ohlrogge, J.B. (2009a). DGAT1 and PDAT1 Acyltransferases Have Overlapping Functions in Arabidopsis Triacylglycerol Biosynthesis and Are Essential for Normal Pollen and Seed Development. *Plant Cell* 21, 3885–3901.
- Zhang, P., Liu, S., Cong, B., Wu, G., Liu, C., Lin, X., Shen, J., and Huang, X. (2011). A novel omega-3 fatty acid desaturase involved in acclimation processes of polar condition from Antarctic ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Mar. Biotechnol. N. Y.* N 13, 393–401.
- Zhang, X., Wei, D., Li, M., Qi, Y., and Xing, L. (2009b). Evolution-related amino acids play important role in determining regioselectivity of fatty acid desaturase from *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Rep.* 36, 567–573.

V. Références Bibliographiques

- Zhang, Y.-M., Chen, H., He, C.-L., and Wang, Q. (2013). Nitrogen Starvation Induced Oxidative Stress in an Oil-Producing Green Alga *Chlorella sorokiniana* C3. PLoS ONE 8.
- Zhou, X.-R., Robert, S.S., Petrie, J.R., Frampton, D.M.F., Mansour, M.P., Blackburn, S.I., Nichols, P.D., Green, A.G., and Singh, S.P. (2007). Isolation and characterization of genes from the marine microalga *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 68, 785–796.
- Zienkiewicz, K., Du, Z.-Y., Ma, W., Vollheyde, K., and Benning, C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and physiological insights. *Biochim. Biophys. Acta*
- BBA - Mol. Cell Biol. Lipids 1861, 1269–1281.
- Zienkiewicz, K., Zienkiewicz, A., Poliner, E., Du, Z.-Y., Vollheyde, K., Herrfurth, C., Marmon, S., Farré, E.M., Feussner, I., and Benning, C. (2017). Nannochloropsis, a rich source of diacylglycerolacyltransferases for engineering of triacylglycerol content in different hosts. *Biotechnol. Biofuel*
