

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

STRATÉGIE DE MARQUAGE ISOTOPIQUE DE LA MEMBRANE LIPIDIQUE  
DE BACTÉRIES ET DE MICROALGUES POUR LA RÉSONANCE  
MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DU DEUTÉRIUM DE L'ÉTAT SOLIDE *IN*  
*CELLULO*

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

JEAN-PHILIPPE BOURGOUIN

JANVIER 2020

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je suis reconnaissant envers l'équipe de la professeure Isabelle Marcotte avec Dror E. Warschawski et Alexandre A. Arnold. Votre aide en termes de vulgarisation scientifique et en compétences techniques a facilité mon passage de ces deux dernières années. J'ai reçu de la part de l'équipe plusieurs encouragements pour persévérer dans ce domaine ainsi que pour surpasser mes limites. Ces efforts m'ont alors permis d'obtenir des bourses d'études et de me concentrer uniquement sur mon projet de recherche. Je me considère également chanceux d'être allé présenter mon projet de recherche dans un congrès international aux États-Unis. Je vous remercie tous pour votre temps en termes de patience et d'aide qui ont participé à mon perfectionnement.

J'exprime également de la gratitude envers les autres étudiants du laboratoire que j'ai côtoyés, soit : Zeineb Bouhleb, Laurence Caron, Andrée Gravel, Kiran Kiran, Marwa Laadhari, Mahsa Mahabadi, Oriana Meek-Sauriol, Pierre Llido, Alexandre Poulhazan, Oscar Quintana, Mathew Sebastio et Vicky Vo. J'ai vécu de bons moments et des échanges sympathiques ainsi que théoriques. J'ai appris quelque chose de nouveau avec chacun d'entre vous qui a été bénéfique pour ma croissance personnelle ainsi que professionnelle.

Je remercie chacune des personnes pour votre temps et vos compétences techniques qui m'ont permis de mener mon projet à bien : Luc Arsenault, Gwenaël Chamoulaud, Sophie Chen, Charlotte de la Chevrotière, David Dewez, Fesko Consultant, Bertrand Genard, Marie-Claude Giguère, Jacqueline Hue Tieu, Sonia Lachance, Isabelle Rheault, Anthony Skvarenina, Galyna Shul et Francesca Zito.

Je suis également reconnaissant pour le soutien financier envers les bourses et organismes subventionnaires soit : Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), Fondation de l'UQAM, Fonds de recherche du Québec en nature et technologies (FRQNT), Groupe de recherche axé sur la structure des protéines (GRASP), Ressources aquatiques Québec (RAQ) et la bourse de voyage de la Société de biophysique pour le financement. Mes parents ont également été d'une grande aide financière fortement appréciée. Je me considère très chanceux d'avoir fait le plein de connaissances sans soucis financiers.

Je suis heureux d'avoir tissé des liens d'amitié avec des étudiants de l'UQAM tels que : Danny Chhin, Mélanie Côté-Cyr, Souleimen Jmii, Antoine Juneau, Phuong T. Nguyen, Alexandre Poulhazan, Laurence Savignac et Ximena Zottig. Vous avez tous contribué à me faire apprécier mon parcours académique! Votre support moral m'a été d'une grande aide!

Finalement, je remercie ma famille et mes amis proches (Cloé, Geneviève, James, Médéric, Mélanie et Shiva) qui m'ont écouté et encouragé. Vos échanges m'ont permis de relativiser et d'apprécier ce qui s'offre à moi.

Merci.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	xix
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS .....	xxiii
RÉSUMÉ.....	xxv
ABSTRACT .....	xxvii
CHAPITRE I INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Membrane .....	1
1.2 Homéostasie et organisation membranaire .....	3
1.3 Analyse membranaire et applications .....	7
1.3.1 Membrane de bactéries .....	8
1.3.2 Précédent du marquage ( <i>E. coli</i> ) .....	12
1.3.3 Membrane de microalgues ( <i>C. reinhardtii</i> ) .....	17
1.4 Projet - Marquage endogène .....	19
1.4.1 Objectifs et approches .....	21
1.4.2 Structure du document .....	22
1.5 <i>Escherichia coli</i> .....	23
1.5.1 Paroi .....	24
1.5.2 Lipide .....	25
1.5.3 Incorporation des acides gras .....	28
1.5.4 Souche mutante .....	29
1.6 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	30
1.6.1 Intérêts biotechnologiques et espèce sentinelle.....	31

1.6.2	Paroi .....	32
1.6.3	Lipide .....	33
CHAPITRE II MÉTHODOLOGIE.....		37
2.1	Protocoles de marquage au deutérium pour <i>Escherichia coli</i> .....	38
2.1.1	Matériel et méthode.....	38
2.1.2	Inoculum et contrôle de la qualité de la souche bactérienne.....	39
2.1.3	Culture de bactéries entièrement deutérées.....	41
2.1.4	Extraction lipidique à haut rendement (Bactérie) .....	45
2.1.5	Protocole de saponification utilisé .....	48
2.1.6	Marquage des lipides d' <i>E. coli</i> au deutérium.....	49
2.1.7	Viabilité cellulaire des bactéries .....	51
2.2	Protocoles de marquage isotopique pour les microalgues ( <i>C. reinhardtii</i> ) .....	52
2.2.1	Matériel .....	52
2.2.2	Milieu minimal et conditions de culture .....	52
2.2.3	Acclimation au milieu deutéré .....	53
2.2.4	Culture de microalgues entièrement deutérées .....	54
2.2.5	Extraction lipidique des microalgues entièrement deutérées.....	54
2.2.6	Marquage des microalgues avec les lipides deutérés.....	55
2.2.7	Viabilité cellulaire des microalgues.....	56
2.3	Analyse des chaînes d'acides gras par GC-MS .....	58
2.3.1	Extraction lipidique sur petite masse (5-10 mg) .....	58
2.3.2	Méthylation .....	59
2.3.3	Standard.....	60
2.3.4	Méthode d'analyse .....	61
2.3.5	Traitement spectral.....	63
2.4	Analyse de RMN .....	64
2.4.1	RMN en solution (Bactéries) .....	64
2.4.2	RMN de l'état solide (RMN-ÉS) .....	66
2.4.3	Traitement (RMN-ÉS) .....	67
2.5	Notions théoriques de la RMN du deutérium .....	68
2.5.1	Écart quadripolaire rigide.....	69
2.5.2	Écart quadripolaire .....	72
2.5.3	Rotation à l'angle magique (MAS).....	74
2.5.4	Second moment.....	75
CHAPITRE III RÉSULTATS ET DISCUSSION .....		79

3.1	Optimisation du marquage exogène d' <i>E. coli</i> au $^2\text{H}$ .....	80
3.1.1	Effet de la phase de croissance.....	81
3.1.2	Effet de la concentration en acides gras exogènes ajoutés.....	86
3.1.3	Taux de marquage au $^2\text{H}$ .....	92
3.1.4	Fluidité membranaire .....	93
3.1.5	Synthèse des résultats.....	95
3.2	Comparaison des marquages exogène et endogène d' <i>E. coli</i> .....	95
3.2.1	Caractérisation des lipides de marquage .....	96
3.2.2	Comparaison des profils d'acides gras.....	104
3.2.3	Taux de marquage au $^2\text{H}$ .....	106
3.2.4	Fluidité membranaire .....	111
3.2.5	Viabilité cellulaire d' <i>E. coli</i> .....	113
3.2.6	Synthèse de résultats .....	114
3.3	Comparaison des marquages exogène et endogène de <i>C. reinhardtii</i> .....	116
3.3.1	Caractérisation des lipides de marquage .....	116
3.3.2	Profil d'acides gras (comparaison exogène et endogène) .....	119
3.3.3	Fluidité membranaire .....	123
3.3.4	Viabilité (analyse de cytométrie en flux) .....	127
3.3.5	Synthèse des résultats.....	130
	CONCLUSION .....	135
	ANNEXE A PROTOCOLES SIMPLIFIÉS .....	143
	ANNEXE B TABLEAUX ET FIGURES SUPPLÉMENTAIRES .....	153
	ANNEXE C MEMBRANE FLUIDE ET RIGIDE 0,19 MM ( <i>E. COLI</i> ).....	163
	ANNEXE D MARQUAGE EXOGÈNE NATUREL ( <i>C. REINHARDTII</i> ).....	167
	RÉFÉRENCES.....	178



## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1 Exemple d'une bicouche lipidique et d'une porine..... 3
- Figure 1.2 Assemblage de lipides polaires (monomère) en micelle et membrane. 4
- Figure 1.3 Changement de phase d'une bicouche lipidique en phase lamellaire gel ( $L_{\beta}$ ) à la phase liquide cristalline ( $L_{\alpha}$ ) au-delà de la température de transition ( $T_m$ ). ..... 5
- Figure 1.4 Diversité d'acides gras sur les phospholipides (phosphatidylcholine et phosphatidylglycérol) retrouvés dans les membranes bactériennes communes..... 7
- Figure 1.5 Morphologie d'*E. coli* exposé à des nanofeuilles d'oxyde de graphène. La densité de phospholipides est réduite à la surface, le mécanisme de type B indique que les nanofeuilles extraient les phospholipides. Adaptée de [12] avec permission. .... 10
- Figure 1.6 Spectre RMN- $^2\text{H}$  d'*E. coli* marquée à l'acide palmitique deutéré à 37 °C, a) spectre enregistré de 2,5 h à 6 h, b) 6,5 h à 8,5 h, c) 8,5 h à 18 h. Adaptée avec augmentation de la qualité de [17] avec permission..... 13
- Figure 1.7 a) Spectre RMN- $^2\text{H}$  d'*E. coli* LA8 marquée à l'acide palmitique deutéré à 37°C en présence de différentes concentrations de MSI-78, b) premier

	moment, c) second moment, d) paramètre delta. Adaptée de [18] avec permission.....	14
Figure 1.8	Spectre RMN- <sup>2</sup> H d' <i>E. coli</i> marquée à l'acide palmitique deutéré à 37 °C, a) cellules intactes, b) cellule en présence de polymyxine b, c) fullerol, d) chlorure de cetyltriméthyleammonium. Adaptée de [19] avec permission.....	15
Figure 1.9	Spectre RMN- <sup>2</sup> H d' <i>E. coli</i> marquée à l'acide palmitique deutéré à différentes températures, à gauche en mode statique et à droite avec rotation à l'angle magique. Adaptée de [15] avec permission. ....	16
Figure 1.10	Structure moléculaire du 1,6-diphényle-1,3,5-hexatriène (DPH) et du <i>SYTOX Green</i> . ....	17
Figure 1.11	Structure moléculaire du polybromodiphényléther (PBDE) et du tétraborobisphénol A (TBBPA).....	18
Figure 1.12	Structure moléculaire de l'anthracène.....	18
Figure 1.13	Schématisme des marquages exogène et endogène. ....	21
Figure 1.14	Souche d' <i>E. coli</i> de catégorie entérotoxigénique avec <i>fimbriae</i> . Adaptée de [33] avec permission.....	24
Figure 1.15	Représentation simplifiée de la paroi d' <i>E. coli</i> , inspiré de [8, 34].....	25
Figure 1.16	Principales têtes polaires retrouvées chez <i>E. coli</i> et lipide A [36]. ....	26

Figure 1.17	Représentation des principaux acides gras retrouvés chez <i>E. coli</i> . ....	27
Figure 1.18	Schéma général de l'incorporation des acides gras. Adaptation de [39]. .....	29
Figure 1.19	Schématisation des organelles de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> adaptée de [42] sur cliché de microscopie électronique à balayage sans droit d'auteur de <i>Dartmouth Electron Microscope Facility, Dartmouth College</i> . ....	31
Figure 1.20	Schématisation de la paroi et de la membrane cellulaire de <i>C. reinhardtii</i> , Adaptation de [46]. ....	33
Figure 1.21	Têtes polaires des lipides retrouvées chez <i>C. reinhardtii</i> . ....	34
Figure 1.22	Principaux acides gras retrouvés dans les lipides de <i>C. reinhardtii</i> . ...	35
Figure 2.1	Perturbation de l'effet <i>Zeeman</i> par l'effet quadripolaire et représentation de l'écart quadripolaire, adaptation de [65, 66]. ....	68
Figure 2.2	Représentation des éléments de la constante de couplage quadripolaire pour le benzène et cyclohexane, le potentiel électrostatique est utilisé pour représenter le gradient de champs électriques. ....	70
Figure 2.3	Représentation de la composante angulaire de l'éclatement quadripolaire rigide pour un phospholipide avec un seul atome deutéré dans deux orientations. ....	71
Figure 2.4	Spectre de poudre théorique pour une membrane multilamellaire avec des phospholipides ayant un seul deutéron [66]. ....	71

Figure 2.5	Variation du paramètre d'ordre sur une chaîne acyle d'une membrane modèle, Adaptation de Marcotte [66].....	73
Figure 2.6	Spectre de RMN du $^2\text{H}$ de lipides deutérés, en mode statique (rouge) et avec MAS (vert) à une vitesse de rotation de 10 kHz.....	74
Figure 2.7	Spectre de RMN du $^2\text{H}$ d'une membrane rigide (bleu) et d'une membrane fluide (rouge) pour <i>E. coli</i> en rotation à l'angle magique à 10 kHz. Marquage lipidique d'acide palmitique deutéré et oléique à 0,19 mM de bactéries récoltées à la phase mi-exponentielle. La culture fraîche est présentée en bleu et la culture incubée dans une saline pendant 2h30 en rouge.....	77
Figure 3.1	Courbe de croissance d' <i>E. coli</i> dans le milieu LB à 37 °C (220 rpm) avec acides palmitique et oléique à 0,19 mM.....	82
Figure 3.2	Spectre RMN $^2\text{H}$ d' <i>E. coli</i> à différentes phases de croissances, marquée avec 0,19 mM de PA-d <sub>31</sub> et de OA à 37 °C. MAS à 10 kHz.....	83
Figure 3.3	Spectre RMN $^2\text{H}$ d' <i>E. coli</i> à 37 °C marquée à 0,19 mM PA-d <sub>31</sub> et OA à la phase mi-log. Culture fraîche (en bas). Culture incubée à 37 °C pendant 2h30 dans une saline (en haut). MAS à 10 kHz.....	85
Figure 3.4	Profil d'acides gras (pourcentage molaire relatif) du témoin et de la bactérie marquée avec 0,05 mM, 0,10 mM et 0,19 mM d'acides gras exogènes récoltés à la phase mi-log. ....	88

Figure 3.5	Profil d'acides gras (pourcentage molaire relatif) du témoin et de la bactérie marquée avec 0,05 mM, 0,10 mM et 0,19 mM d'acides gras exogènes et récoltée à la phase fin-log. ....	91
Figure 3.6	Pourcentage de marquage (C14:0 et C16:0 deutérés) pour la phase mi-log ainsi que la fin-log. ....	92
Figure 3.7	Second moment moyen ( $M_2$ ) des cultures fraîches d' <i>E. coli</i> en fonction de la concentration (mM) de PA-d <sub>31</sub> et OA ajoutés à la culture, récoltée à la phase mi-log et fin-log. ....	94
Figure 3.8	Spectre de RMN <sup>2</sup> H sur des cellules d' <i>E. coli</i> fraîches entièrement deutérées, MAS à 10 kHz. ....	97
Figure 3.9	Spectre de RMN en solution des lipides produits par <i>E. coli</i> cultivée dans le milieu LR D <sub>2</sub> O 70 %. Bleu : spectre du proton. Vert : spectre du deutérium (500 µL CDCl <sub>3</sub> , 200 µL MeOH et 50 µL KOH-EDTA 200 mM pH 6). ....	98
Figure 3.10	Spectre de RMN <sup>31</sup> P en solution des lipides produits par <i>E. coli</i> cultivée dans le milieu LR D <sub>2</sub> O 70% (500 µL CDCl <sub>3</sub> , 200 µL MeOH et 50 µL KOH-EDTA 200 mM pH 6). ....	99
Figure 3.11	Profil d'acides gras de la bactérie deutérée (milieu LR D <sub>2</sub> O 70 % récoltée à la phase plateau) comparé à une culture témoin (milieu LB H <sub>2</sub> O récoltée à la phase fin-log). ....	102

Figure 3.12	Profil d'acides gras pour les marquages exogène et endogène comparés à un témoin, pour des bactéries récoltées à la phase de croissance fin-log. ....	106
Figure 3.13	Pourcentage relatif molaire d'acides gras froids et deutérés des marquages exogène et endogène. ....	109
Figure 3.14	Pourcentage relatif des acides gras deutérés incorporés comparé avec le mélange d'acides gras deutérés fournis. ....	111
Figure 3.15	Spectre de RMN $^2\text{H}$ des marquages exogène et endogène d' <i>E. coli</i> récoltée à la fin de la phase exponentielle, MAS à 10 kHz. ....	112
Figure 3.16	Spectre de RMN $^2\text{H}$ de <i>C. reinhardtii</i> deutérée à 50 % et lyophilisée. En rouge le spectre statique épouse les bandes de rotation du spectre MAS à 10 kHz en vert à 25 °C. ....	117
Figure 3.17	Pourcentage relatif des principaux acides gras retrouvé dans <i>C. reinhardtii</i> pour un témoin et la microalgue deutérée. ....	119
Figure 3.18	Profil d'acides gras pour les marquages exogène et endogène de <i>C. reinhardtii</i> , comparé à un témoin. ....	121
Figure 3.19	Spectre de RMN $^2\text{H}$ de <i>C. reinhardtii</i> marquée avec les lipides exogènes à gauche (1024 acquisitions) et endogènes à droite (12 288 acquisitions) tous deux à 25 °C, MAS à 10 kHz. ....	125
Figure 3.20	Microscopie par fluorescence de <i>C. reinhardtii</i> avec un phosphocholine-NBD. ....	126

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Proportion relative des principales têtes polaires retrouvées chez <i>E. coli</i> et lipide A. Compilation de données [8, 36, 37].....	26
Tableau 1.2	Principaux acides gras retrouvés chez <i>E. coli</i> .....	27
Tableau 1.3	Chaînes acyles en fonction des têtes polaires [37].....	28
Tableau 1.4	Principales classes de lipides polaires retrouvées chez <i>C. reinhardtii</i> et pourcentage relatif. Adaptation de [48].....	34
Tableau 1.5	Principaux acides gras retrouvés chez <i>C. reinhardtii</i> et pourcentage relatif massique. Adaptation de [49]. .....	35
Tableau 1.6	Têtes polaires de <i>C. reinhardtii</i> et chaînes acyles [48] .....	36
Tableau 2.1	Différentes rampes de température pour séparer les acides gras par GC-MS .....	63
Tableau 3.1	Profil d'acides gras en pourcentage relatif molaire, ratio d'acides gras saturés/insaturés et pourcentage de deutération du témoin et de la bactérie marquée à différentes concentrations d'acides gras exogènes (PA-d <sub>31</sub> et OA) à la phase mi-log .....	87

Tableau 3.2	Profil d'acides gras en pourcentage relatif molaire, ratio d'acides gras saturés/insaturés et pourcentage de deutération du témoin et de la bactérie marquée à différentes concentrations d'acides gras exogènes (PA-d <sub>31</sub> et OA) à la phase fin-log.....	90
Tableau 3.3	Second moment (10 <sup>9</sup> s <sup>-2</sup> ) moyen des cultures en phase mi-log et fin-log avec le marquage à trois concentrations de PA-d <sub>31</sub> et OA .....	93
Tableau 3.4	Profil des têtes polaires des phospholipides extraits d' <i>E. coli</i> deutérée.. .....	100
Tableau 3.5	Profil d'acides gras en pourcentage molaire relatif de la bactérie deutérée comparé au témoin.....	101
Tableau 3.6	Analyse des acides gras deutérés utilisés pour le marquage endogène... .....	103
Tableau 3.7	Profil d'acides gras en pourcentage relatif molaire pour les marquages exogène et endogène comparés à un témoin à la phase de croissance fin-log .....	105
Tableau 3.8	Taux de marquage par acide gras du marquage exogène pour trois répliquats.....	107
Tableau 3.9	Taux de deutération par acide gras du marquage endogène pour trois répliquats.....	108
Tableau 3.10	Pourcentage relatif molaire des acides gras deutérés incorporés comparé avec le mélange d'acides gras (AG) deutérés fournis .....	110

Tableau 3.11 Synthèse des informations relatives aux marquages exogène et endogène des bactéries récoltées en fin-log .....	114
Tableau 3.12 Pourcentage relatif molaire des principaux acides gras retrouvés dans <i>C. reinhardtii</i> pour un témoin et la microalgue deutérée .....	118
Tableau 3.13 Profil d'acides gras en pourcentage relatif molaire pour les marquages exogène et endogène de <i>C. reinhardtii</i> , comparé à un témoin .....	120
Tableau 3.14 Taux de marquage des lipides de <i>C. reinhardtii</i> au deutérium via les lipides exogènes deutérés à 100 % .....	122
Tableau 3.15 Taux de marquage des lipides de <i>C. reinhardtii</i> en deutérium via les lipides endogènes deutérés à 50 % .....	122
Tableau 3.16 Pourcentage des populations (Pop.) dans les régions sélectionnées et intensité (Int.) de chlorophylle (Chl.) (unité relative) pour le marquage exogène et endogène.....	128
Tableau 3.17 Pourcentage des populations (Pop.) dans les régions sélectionnées et intensités (Int.) du FDA (unité relative) pour le marquage exogène et endogène.....	129
Tableau 3.18 Synthèse des données pour les marquages exogène et endogène de <i>C. reinhardtii</i> comparé à un témoin .....	131



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

(5%-Phényl)-méthylpolysiloxane	(HP-5ms)
1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine deutéré	(DPPC-d <sub>62</sub> )
1,6-diphényle-1,3,5-hexatriène	(DPH)
1-Palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine	(POPC)
1-Palmitoyl-d <sub>31</sub> -2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine	(POPC-d <sub>31</sub> )
Acide $\alpha$ -linoléique	(C18:3)
Acide cis-11,12-méthylèneoctadecanoïque	(cyC19:0)
Acide cis-9,10-méthylènehexadecanoïque	(cyC17:0)
Acide cis-vaccénique	(C18:1)
Acide désoxyribonucléiques	(ADN)
Acide gras	(AG)
Acide hexadécatétraénoïque	(C16:4)
Acide linoléique	(C18:2)
Acide myristique	(C14:0)
Acide oléique	(C18:1)
Acide oléique froid	(OA; C18:1)
Acide palmitique	(C16:0)
Acide palmitique perdeutérée	(PA-d <sub>31</sub> )
Acide palmitoléique	(C16:1)
Acide pinoléique	(C18:3)
Acide stéarique	(C18:0)
Angle de la liaison carbone-deutérium	( $\theta_{CD}$ )
Bromure de 3	
-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium	(MTT)
Carbone-13	( <sup>13</sup> C)
Cardiolipine	(PC)
<i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i>	(CPMG)
Champ magnétique	(B <sub>0</sub> )
Chloroforme deutéré	(CDCl <sub>3</sub> )
Chlorophylle	(Chl.)
Chlorure de potassium	(KCl)

Chlorure de sodium	(NaCl)
Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	(GC-MS)
Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada	(CRSNG)
Constante de couplage	(C <sub>Q</sub> )
<i>Cross Polarisation</i> (polarisation croisée)	(CP)
Dans la cellule	( <i>in cell</i> )
Densité optique à 600 nm	(DO <sub>600 nm</sub> )
Deutééré	(-d)
Deutérium	( <sup>2</sup> H)
Diacétate de fluorescéine	(FDA)
Diacylglyceryl-triméthylhomoserine	(DGTS)
Diffusion dynamique de la lumière	(DLS)
Digalactosyl-diacylglycérol	(DGDG)
Diméthyle sulfoxyde	(DMSO)
Dodécylphosphocholine	(DPC)
<i>Dwell time</i>	(DW)
Eau lourde	(D <sub>2</sub> O)
Écart quadripolaire	(Δv <sub>Q</sub> )
Endogène	(Endo)
Éosine et bleu de méthylène	(EMB)
Espèces réactives de l'oxygène	(ROS)
État solide	(ÉS)
Éthylènediaminetétraacétique acide	(EDTA)
Éthylènediaminetétraacétique acide partiellement neutralisé à l'hydroxyde de potassium	(EDTA-KOH)
Exogène	(Exo)
<i>Fatty acid methyl esters</i>	(FAME)
Fonds de recherche du Québec en nature et technologies	(FRQNT)
<i>Forward-scattered light</i>	(FSC)
Gradient de champ électrique	(eq)
<i>Gram négatif</i>	( <i>Gram (-)</i> )
<i>Gram positif</i>	( <i>Gram (+)</i> )
Groupe de recherche axé sur la structure des protéines	(GRASP)
Haute densité cellulaire	(HCD)

Hydrocarbures aromatiques polycycliques	(HAPs)
Institut Biologique de Physico-Chimie	(IBPC)
Intensité	(Int.)
<i>LeMaster and Richards</i>	(LR)
Lipopolysaccharides	(LPSs)
<i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i>	(INEPT)
<i>Luria Bertani, Miller</i>	(LB)
Masse sur masse	(m/m)
Masse sur volume	(m/v)
Méthanol	(MeOH)
Minute	(min)
Moment quadripolaire	(eQ)
Monogalactosyl-diacylglycérol	(MGDG)
National Institute of Standards and Technology	(NIST)
Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit	(NADPH)
Nicotinamide adénine dinucléotide réduit	(NADH)
Nitrobenzoxadiazole	(NBD)
Paramètre d'ordre de la liaison carbone-deutérium	(S <sub>CD</sub> )
Peptides antimicrobiens	(PAM)
Peptidoglycane	(PG)
Phosphatidylcholine	(PC)
Phosphatidyléthanolamine	(PE)
Phosphatidylglycérol	(PG)
Phosphore-31	( <sup>31</sup> P)
Polybromodiphényléther	(PBDE)
Population	(Pop.)
Radian	(rad)
Résonance magnétique nucléaire	(RMN)
Ressources aquatiques Québec	(RAQ)
Rotation à l'angle magique	(MAS)
Second moment	(M <sub>2</sub> )
<i>Side-scattered light</i>	(SSC)
Sulfoquinovosyl-diacylglycérol	(SQDG)
Tétrabromobisphénol A	(TBBPA)
Titration calorimétrique isotherme	(ITC)
trans-1,2-cyclohexyldiaminetétraacétique acide	(CDTA)
trans-1,2-cyclohexyldiaminetétraacétique acide	

partiellement neutralisé à l'hydroxyde de césium	(CDTA-CsOH)
Tris-acétate-phosphate	(TAP)
Unités de masse atomique	(Uma)
Unités formatrices de colonie	(UFC)
Université du Québec à Montréal	(UQAM)
Volume sur volume	(v/v)

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

Cellule par millilitre	(cellules/mL)
Degré Celsius	(°C)
Degré Kelvin	(K)
Différence de potentiel, Volt	(V)
Gramme	(g)
Gramme par litre	(g/L)
Hertz, par seconde	(Hz)
Kilohertz	(kHz)
Livre-force par pouce carré	(psi)
Masse volumique ( $\rho$ )	(g/mL)
Mégahertz	(MHz)
Microeinstein	( $\mu\text{mol de photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
Microlitre	( $\mu\text{L}$ )
Micromètre	( $\mu\text{m}$ )
Micromole de photon par mètre carré par seconde	(Microeinstein)
Microseconde	( $\mu\text{s}$ )
Minute	(min)
Milligramme	(mg)
Milligramme par litre	(mg/L)
Millilitre	(mL)
Millimètre	(mm)
Millimolaire, millimole par litre	(mM)
Molaire, Mole par litre	(M)
Nanogramme par litre	(ng/L)
Normale, équivalent molaire par litre	(N)
Partie par milliard, nanogramme par litre	(ppb)
Partie par million, milligramme par litre	(ppm)
Picomole par milligramme	(pmol/mg)
Pourcentage	(%)
Rotation par minute	(rpm)

Second moment ( $M_2$ )	( $s^{-2}$ )
Seconde	(s)
Unité de masse atomique	(amu)
Vitesse de rotation	(Hz)
Watt	(W)

## RÉSUMÉ

Bien qu'étroite, la membrane cellulaire exerce une lourde tâche dans le maintien de l'homéostasie. Elle doit ajuster un niveau favorable de perméabilité entre les molécules bénéfiques ou toxiques tout en s'adaptant aux changements physiques et chimiques de son environnement. L'équipe de recherche de la Pre Marcotte est l'un des rares laboratoires à travers le monde à s'être spécialisé dans l'étude des membranes des microorganismes au sein de leur complexité cellulaire par la résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN-ÉS). C'est la seule technique qui permette d'étudier la dynamique au niveau moléculaire des membranes des microorganismes dans leur état natif. Elle permet de prendre en compte la membrane dans l'organisme entier (*in cellulo*), voire vivant (*in vivo*). Ce type d'analyse permet l'émergence d'un nouvel outil diagnostique de la santé membranaire qui est corrélée à la santé cellulaire. Pour ce faire, il convient d'abord de mettre au point le marquage des lipides de ces microorganismes avec des isotopes stables et sensibles pour la RMN. Plusieurs précurseurs marqués peuvent être utilisés: eau, sucres, acides gras, lipides exogènes (disponibles commercialement) ou, et c'est la nouveauté de cette étude, avec des lipides endogènes synthétisés par le microorganisme en question. Il faudra alors optimiser les paramètres de culture ainsi que la concentration d'acides gras ou de lipides à utiliser. Si l'on arrive à obtenir un marquage des membranes sélectif aux lipides, l'interprétation du signal de la RMN est plus simple. Dans le cas de la RMN du deutérium, les lipides deutérés permettront de sonder les mouvements moléculaires. Cette stratégie sera employée pour étudier la membrane de microorganismes procaryotes (*Escherichia coli*) et eucaryotes (*Chlamydomonas reinhardtii*). Le taux de marquage et le profil d'acides gras seront déterminés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), ce qui permettra d'évaluer l'influence du marquage sur les espèces étudiées. La pertinence d'utiliser des lipides endogènes qui respectent l'intégrité du profil d'acides gras des microorganismes sera également discutée.

Mots clés : Membrane, marquage endogène, RMN-<sup>2</sup>H, GC-MS



## ABSTRACT

The cell membrane is very thin, but it labors very hard to maintain homeostasis. It has to adjust the right level of permeability between beneficial molecules and toxins while constantly adapting to its chemical and physical environment. Marcotte's research group is one of the rare laboratories across the world to be specialized in the study of microorganisms' membranes in intact cells by solid state nuclear magnetic resonance (SS-NMR). It is the only technique for studying membrane dynamics at the molecular level in whole organisms (*in cellulo*) and even living ones (*in vivo*). That kind of analysis allows a new diagnostic tool to emerge for investigations of the membrane and cellular health. To do so, we have to develop a protocol for the labeling of cell membranes with stable NMR isotopes. Several types of precursors can be used for labeling: water, sugars, fatty acid, exogenous lipids (commercially available) or endogenous lipids, our novel methodology, synthesized by the microorganism itself. Here, we optimize culture parameters and the right amount of labeled lipids to use. If we can selectively label cell membrane lipids, NMR signal interpretation will be easier. In the case of deuterium NMR, deuterated lipids can probe molecular motions. This strategy is applied to study prokaryotic (*Escherichia coli*) and eukaryotic (*Chlamydomonas reinhardtii*) microorganisms' membrane. Labeling rate and fatty acids profile are determined by gaseous chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), allowing analysis of labeling impact on microorganisms and quantitative analysis of the extent of labeling. The relevance of using endogenous lipids which respect fatty acid profile integrity will be discussed.

Keywords : Membrane, endogenous labeling,  $^2\text{H}$ -NMR, GC-MS



# CHAPITRE I

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1.1 Membrane

La membrane plasmique est la frontière établie entre le monde extracellulaire et intracellulaire. Elle est majoritairement composée d'unités lipidiques et protéiques qui s'assemblent spontanément en délimitant la cellule. Quant à elle, la cellule est l'unité fondamentale des organismes vivants. Elle est constituée d'un milieu aqueux qui porte des protéines, des sucres et des acides nucléiques cernés par une membrane. Il existe deux types de cellules [1] :

- Les cellules procaryotes sont les premières à avoir vu le jour, il y a plus de 3,5 milliards d'années. Elles sont représentées par les microorganismes unicellulaires comme les bactéries et les archées. Elles possèdent une faible taille généralement comprise entre 1 et 2  $\mu\text{m}$ . Leurs acides désoxyribonucléiques (ADN) sont circulaires et peuvent s'apparenter à un unique chromosome qui flotte dans le cytosol dépourvu de noyau.
- Les cellules eucaryotes sont quant à elles apparues il y a 1,5 milliard d'années. Elles peuvent être représentées par des microorganismes unicellulaires comme les microalgues ou par des organismes plus complexes comme les mammifères. La taille de ces cellules peut varier de 5 à 100  $\mu\text{m}$ . Leurs ADN linéaires sont fragmentés en chromosomes qui sont conservés dans leur noyau.

La cellule eucaryote possède des organelles responsables de certaines fonctions précises. Les mitochondries et les chloroplastes sont deux organelles responsables de la production énergétique. Une partie de leur code génétique est conservée sous forme d'ADN circulaire, comme dans les bactéries. La théorie endosymbiotique stipule que respectivement, une bactérie aérobie ainsi qu'une cyanobactérie seraient à l'origine de ces organelles au sein de la cellule eucaryote [1].

Ces deux organelles possèdent deux membranes (externe et interne). Dans les mitochondries et les chloroplastes, leurs membranes doivent être suffisamment robustes pour établir un gradient de protons entre deux régions. Ce gradient permet alors de faire fonctionner l'ATP synthase, une protéine membranaire qui produit l'ATP, essentielle à la vie [1]. Il convient donc de s'attarder aux propriétés biophysiques de la membrane d'un point de vue fondamental.

La membrane se présente sous la forme d'une bicouche lipidique qui tapisse les limites des organelles et de la cellule entière. Elle est majoritairement composée de lipides polaires comme les phospholipides ou les glycolipides. La bicouche lipidique est donc perméable aux molécules neutres comme le dioxygène et le dioxyde de carbone ainsi qu'aux molécules hydrophobes [1].

Pour que les ions pénètrent ou sortent de la membrane, ils doivent passer par des canaux constitués de protéines membranaires en forme de tube comme les porines. D'autres canaux peuvent s'ouvrir et se refermer et être spécifiques à certains ions. Chez les eucaryotes, le glucose entre dans la cellule via des transporteurs qui le laissent uniquement passer sous l'action d'une hormone [1].

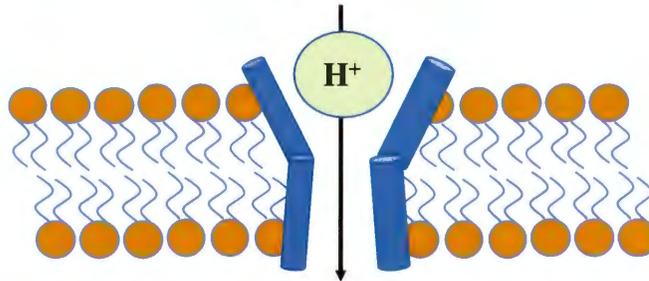


Figure 1.1 Exemple d'une bicouche lipidique et d'une porine.

En plus d'avoir une fonction de compartimentation, la membrane et ses protéines membranaires permettent donc la régulation des métabolites, du pH et d'une composition ionique adéquate [2]. L'homéostasie est maintenue et les réactions chimiques au sein de la cellule ou des organelles peuvent donc s'y effectuer [1].

## 1.2 Homéostasie et organisation membranaire

Comme expliqué par Luckey *et al.* [2], la membrane peut être considérée comme un polymère où plusieurs résidus (lipides et protéines) s'y assemblent spontanément via des interactions hydrophobes et autres types de liaisons de faible énergie. Lorsque les molécules d'eau sont exposées aux résidus hydrophobes des lipides polaires, il se forme une cage d'eau autour de l'acide gras. Ceci n'est pas favorable entropiquement, car ces molécules ont une quantité de mouvement réduite et certains ponts hydrogène peuvent être non exploités. Ces lipides seront donc spontanément regroupés afin de libérer les molécules d'eau. Certains lipides polaires avec une forme conique pourront former des micelles et d'autres cylindriques, formeront des bicouches lipidiques. Ces formations seront par la suite stabilisés par les liaisons de *Van der Waals* entre les chaînes acyles. Les protéines membranaires sont intégrées au sein de la membrane en exposant leurs résidus hydrophobes à la partie hydrophobe de la membrane, tandis que les résidus

polaires sont exposés à l'environnement aqueux. Des liaisons électrostatiques et des ponts hydrogène peuvent se former entre les têtes polaires et les protéines membranaires.

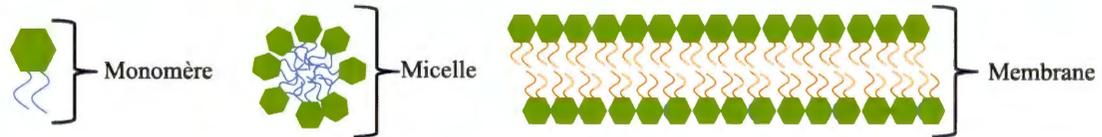


Figure 1.2 Assemblage de lipides polaires (monomère) en micelle et membrane.

Il est également indiqué par Luckey *et al.* [2] que les lipides et les protéines membranaires peuvent surtout bouger de façon latérale dans la membrane. Pour que les protéines membranaires effectuent leur travail de façon adéquate, elles doivent être bien portées par les lipides qui composent la membrane. Dans les conditions homéostatiques, la membrane est un volume fluide à deux dimensions, ou un cristal liquide. Cette fluidité, selon le modèle de la mosaïque fluide, permet d'assurer les interactions protéine-protéine et protéine-lipide. Les propriétés biophysiques de la membrane peuvent avoir une incidence sur les réactions biochimiques qui s'y effectuent.

Dans les cellules de mammifères, il y a de fortes études qui confirment la présence de radeaux lipidiques comme présentées par Epanand *et al.* [3]. Ces objets membranaires résultent de l'association, à l'échelle nanométrique de plusieurs sphingolipides, cholestérols et protéines membranaires. Les radeaux lipidiques pourraient être un lieu de fonctionnalisation bioactif qui voguerait sur la membrane. Il s'agit d'une association lipide-protéine qui a une incidence sur l'ordre lipidique.

Il a été également démontré que chez les bacilles, qu'un domaine riche en cardiolipine, un lipide chargé négativement, et en protéines membranaires cationiques se forme à la région polaire pour conférer la forme concave de la membrane [4].

Tel que présenté dans le livre de Shechter [5], les lipides en phase lamellaires sont en conformation ordonnée lorsque toutes les liaisons carbone-carbone des chaînes acyles sont en configuration *tout trans*. Les chaînes sont stabilisées par les interactions hydrophobes sous une forme étirée et parallèle comme présentée dans la phase lamellaire gel ( $L_\beta$ ) de la figure 1.3. Une élévation de la température peut briser les interactions hydrophobes en introduisant des défauts gauches. L'isomérisation de la simple liaison carbone-carbone d'une chaîne acyle *trans* à gauche change sa direction, ce qui nuit donc au parallélisme des chaînes. Une élévation plus importante de la température va briser tout l'ordre des chaînes, elles seront alors en conformation désordonnée où leurs orientations moyennes sont perpendiculaires au plan de la membrane, comme présenté dans la phase lamellaire liquide cristalline ( $L_\alpha$ ) de la figure 1.3. La température qui caractérise ce changement de conformation est appelée « température de transition » ou « *melting temperature* » ( $T_m$ ). Le changement de phase ordonnée à désordonnée réduit l'épaisseur de la membrane et provoque une expansion latérale des lipides, comme présentés à la figure 1.3.

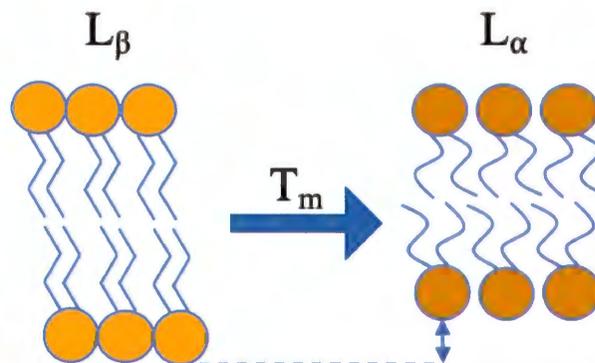


Figure 1.3 Changement de phase d'une bicouche lipidique en phase lamellaire gel ( $L_\beta$ ) à la phase liquide cristalline ( $L_\alpha$ ) au-delà de la température de transition ( $T_m$ ).

Comme présenté dans la revue de la littérature de Mykytczuk [6], la fluidité membranaire d'une composition d'un mélange de lipides polaires donné va varier en fonction de la température ainsi que d'autres paramètres physico-chimiques tels que le pH, les ions, la pression et le taux d'hydratation. Une membrane est généralement considérée comme fluide dans la dimension latérale sous sa forme biologiquement active dans la phase lamellaire liquide cristalline ( $L_{\alpha}$ ). Les microorganismes peuvent abaisser la température de transition de leurs membranes en adaptant leurs lipides comme présenté à la figure 1.4. Premièrement, ils synthétisent une variété d'acides gras avec différentes longueurs de chaînes pour briser l'ordre de la cristallisation. Les acides gras plus courts (C14) ont une température de transition plus faible que les longs (C18). D'une manière plus importante, le taux d'insertion d'insaturations dans les acides gras va abaisser la température de transition. Les insaturations en conformation *cis* vont conférer un plus grand volume de mouvements à l'acide gras et briser des liaisons *Van der Waals*. Les insaturations *trans* ont un effet similaire, mais avec une plus faible amplitude. Certaines bactéries à *Gram (+)* ont des acides gras branchés qui réduisent l'ordre avec leur diversité ce qui abaisse la température de transition. Ces acides gras branchés peuvent stabiliser la membrane à de plus hautes températures.

Les bactéries à *Gram (-)* utilisent des acides gras insaturés pour fluidifier leurs membranes. Elles synthétisent également des cyclopropyles pour fluidifier leurs membranes et augmenter la résistance aux chocs acides ou de températures [7].

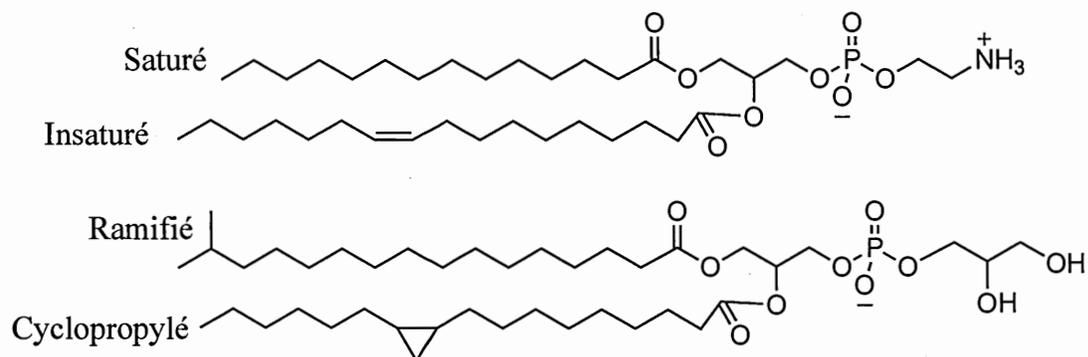


Figure 1.4 Diversité d'acides gras sur les phospholipides (phosphatidylcholine et phosphatidylglycérol) retrouvés dans les membranes bactériennes communes.

### 1.3 Analyse membranaire et applications

Actuellement, peu de techniques permettent d'analyser la fluidité des membranes biologiques au niveau moléculaire. Il est d'un grand intérêt d'étudier les membranes, tant fondamentalement pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, que pour suivre l'effet de xénobiotiques comme les peptides antimicrobiens [8]. L'analyse des membranes pourrait également servir à des fins environnementales, par exemple, pour analyser l'impact d'une bioaccumulation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans une membrane de microalgues. Comme présenté par Hellou *et al.* [9], des HAP issus du pétrole ou des incendies, comme le phénanthrène, fluoranthène et le pyrène, sont retrouvés sous forme soluble (ppb) dans les eaux douces canadiennes ainsi que dans les eaux salées à travers le monde et se bioaccumulent dans les moules.

### 1.3.1 Membrane de bactéries

L'une des approches les plus simples pour analyser les membranes consiste à construire des membranes modèles avec des lipides polaires disponibles commercialement. Des liposomes endogènes peuvent être également formés suite à l'extraction des lipides polaires d'un microorganisme. Les liposomes peuvent être analysés par la libération de colorant lors de leurs ruptures [10]. Cette approche est un bon point de départ, mais elle ne prend pas en compte les protéines membranaires et d'autres constituants comme la paroi cellulaire. La seconde approche est l'analyse de la cellule entière (*in cellulo*). Celle-ci prend donc en compte l'intégrité cellulaire. L'analyse la plus robuste est cependant celle des cellules vivantes (*in vivo*) [8]. La membrane de l'organisme en entier peut être étudiée par des techniques comme la polarisation de la fluorescence, la microscopie électronique et la résonance magnétique nucléaire (RMN) présentée dans cette section.

L'analyse de la polarisation de la fluorescence permet d'analyser la fluidité membranaire grâce à une sonde fluorescente comme par Mykytczuk *et al.* [6]. Cette sonde est une molécule non polaire ainsi que linéaire, ce qui va lui permettre de s'insérer verticalement entre les deux feuillettes d'une bicouche lipidique. Le principe repose sur le fait qu'un faisceau laser à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore sera focalisé sur l'échantillon et que deux détecteurs réglés à la longueur d'onde d'émission placés parallèlement et perpendiculairement à l'échantillon enregistreront le signal. Un traitement mathématique permettra alors de traduire les différences d'intensité entre les détecteurs en amplitude de mouvement à travers le temps de la sonde qui suit les mouvements membranaires. L'analyse de la bicouche lipidique des bactéries peut nous apporter des informations fondamentales sur l'état natif des membranes à savoir comment la bactérie peut s'adapter à une température de croissance, à une pression osmotique ou physique. La technique de la polarisation de la fluorescence a donc été utilisée pour analyser les variations de fluidité de la

membrane au moyen du ratio de polarisation. De telles informations nous offrent une meilleure compréhension sur les étonnantes capacités adaptatives des microorganismes. Cette technique pourrait également analyser l'effet d'un xénobiotique sur une membrane. Cette technique est relativement abordable, mais a comme inconvénient d'introduire une molécule exogène dans la membrane, ce qui peut donc en altérer sa fluidité intrinsèque comme présentée dans par Leung et Thewalt [11].

La technique de microscopie électronique en transmission permet de visualiser les membranes. Cette technique offre un aperçu d'un univers inaccessible au moyen d'une image. Bien que ces dernières puissent faire rêver, elles n'offrent qu'une fraction statique d'un monde en mouvement. Néanmoins, cette technique a permis d'illustrer comment les nanofeuilles d'oxyde de graphène peuvent exfolier la membrane d'*E. coli* tel que présenté à la figure 1.5 [12].

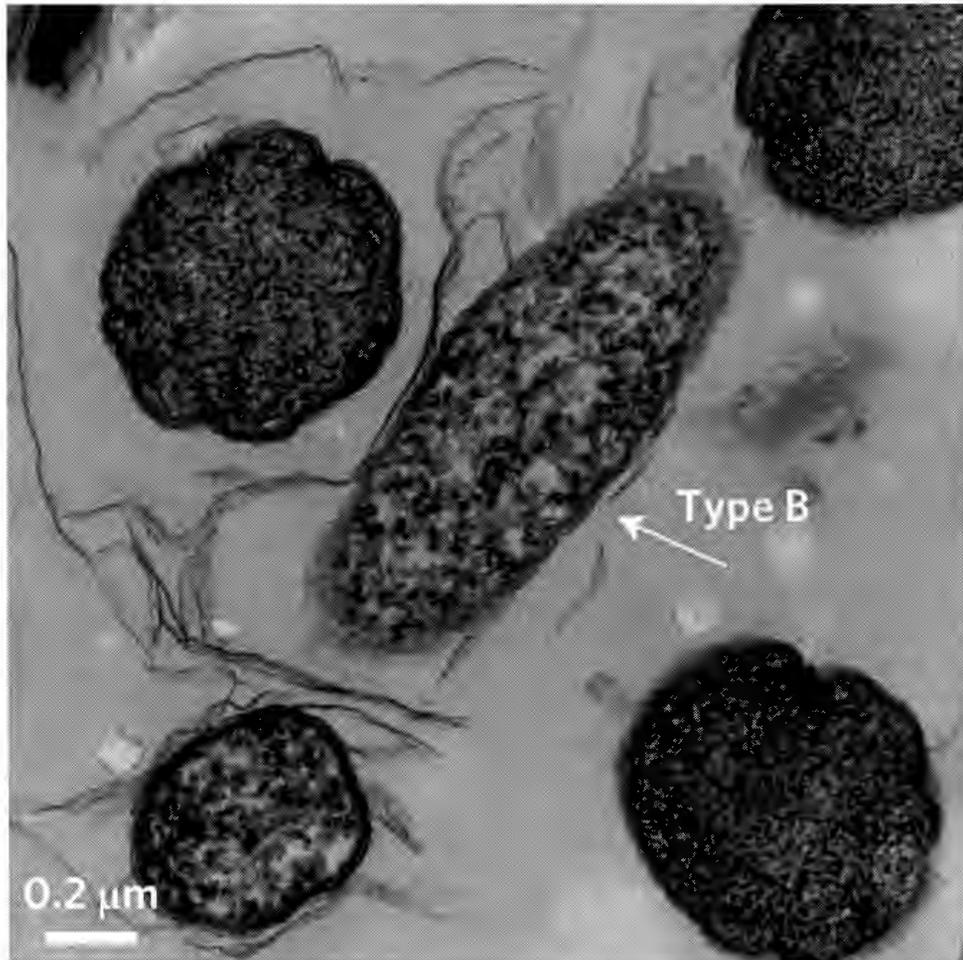


Figure 1.5 Morphologie d'*E. coli* exposé à des nanofeuilles d'oxyde de graphène. La densité de phospholipides est réduite à la surface, le mécanisme de type B indique que les nanofeuilles extraient les phospholipides. Adaptée de [12] avec permission.

Dans le contexte du problème mondial de résistance aux antibiotiques, l'une des applications de l'étude membranaire de bactéries qui peut être le plus utile à la société consiste en l'étude de l'effet d'antibiotiques des peptides antimicrobiens (PAM) [13]. Comme ces molécules biodégradables s'attaquent directement à la membrane, elles laissent donc peu de chance à la bactérie de développer une résistance [8]; elles sont considérées comme une alternative thérapeutique intéressante aux antibiotiques

classiques. Des techniques colorimétriques avec des liposomes de membranes modèles peuvent donner une bonne piste de départ pour comprendre les mécanismes d'actions des PAM. Par contre, il vaut mieux étudier une bactérie entière pour voir, par exemple, si les PAM réussissent à franchir la barrière de LPS. En effet, une concentration 100 fois plus forte de PAM peut être nécessaire pour observer un effet sur les bactéries en comparaison des membranes modèles [8].

La RMN *in vivo* offre la possibilité d'étudier les PAM en observant plusieurs noyaux de la membrane [8]. Il est possible de récolter des premiers indices sur une bactérie non marquée au moyen du phosphore ( $^{31}\text{P}$ ). Comme le phosphore est situé dans la partie polaire des lipides, ce noyau peut donc nous informer sur les interactions de surface du PAM. Le cœur hydrophobe de la membrane, soit les chaînes acyles, peut être sondé au moyen de la RMN du deutérium ( $^2\text{H}$ ) sur des chaînes acyles deutérés. La synthèse des informations récoltées permet d'émettre une hypothèse à savoir comment le PAM interagit avec la membrane [8]. Une meilleure compréhension du mécanisme d'action des PAM peut mener à la synthèse de molécules plus efficaces qui pourraient améliorer la qualité de vie de la population en respectant l'environnement (molécules biodégradables).

La RMN permet d'analyser la dynamique du cœur hydrophobe des membranes au moyen du deutérium, car le signal est affecté par l'ordre des lipides. Le noyau de deutérium est présent en faible abondance naturelle (0,01 %) et offre donc la possibilité de marquer sélectivement (généralement) la membrane. Le marquage de la membrane des bactéries avec des chaînes acyles deutérées est effectué en offrant des acides gras deutérés à la bactérie qui les incorporent [8]. Cette approche fonctionne sur plusieurs bactéries comme *B. subtilis*, *E. coli* et *V. splendidus* [14-16].

Une théorie plus approfondie de la RMN- $^2\text{H}$  est présentée dans la section 2.5 sur le paramètre d'ordre des chaînes acyles relié à leur amplitude de mouvements des liaisons carbone-deutérium dans le champ magnétique. La prochaine section présente l'historique du marquage des bactéries au deutérium.

### 1.3.2 Précédent du marquage (*E. coli*)

Le marquage des cellules intactes d'*E. coli* avec des acides gras deutérés exogènes a été documenté dans la littérature en 1979 par James H. Davis sous la direction de Myer Bloom au Canada. Les auteurs ont utilisé une souche de bactérie (L51) qui ne pouvait pas effectuer la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Ils ont utilisé une concentration d'acide palmitique perdeutééré (PA- $\text{d}_{31}$ ) de 0,17 mM. Ils ont également précisé que la même quantité massique d'acide oléique doit être utilisée pour préserver le ratio de lipides saturés/insaturés. Pour solubiliser les lipides, le *Brij-58* a été utilisé comme détergent qui permet de micelliser les acides gras. Les bactéries marquées ont été récoltées au milieu de la phase exponentielle à une densité optique à 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ ) de 1,2. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre RMN 224 MHz avec un écho, à une température de 37 °C. La membrane a été caractérisée à l'aide de moments spectraux (voir section 2.5.4). Les cellules intactes ont été caractérisées ainsi que des fractions de membranes. Les auteurs ont remarqué que les cellules intactes se dégradent entre 6 h et 18 h. Les spectres sont présentés à la figure 1.6.

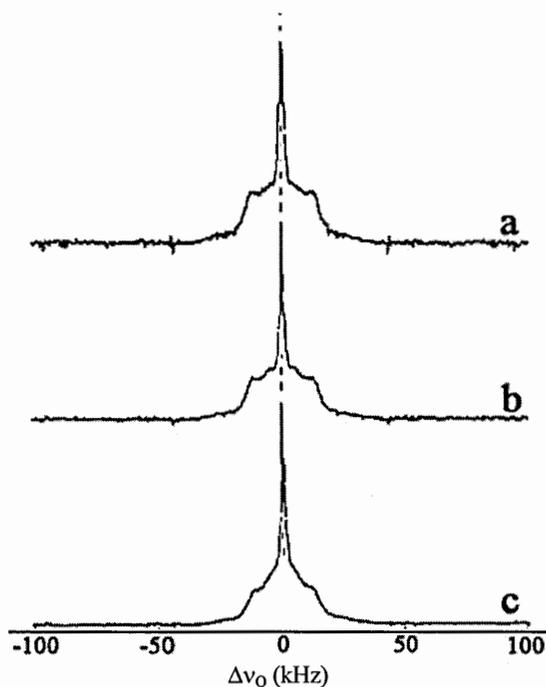


Figure 1.6 Spectre RMN- $^2\text{H}$  d'*E. coli* marquée à l'acide palmitique deutéré à 37 °C, a) spectre enregistré de 2,5 h à 6 h, b) 6,5 h à 8,5 h, c) 8,5 h à 18 h. Adaptée avec augmentation de la qualité de [17] avec permission.

En 2011, toujours au Canada, un second mutant a vu le jour dans le laboratoire de Valerie Booth. Ce mutant LA8 ne peut synthétiser des acides gras ou les  $\beta$ -oxyder. Une concentration de 0,17 mM de PA- $\text{d}_{31}$  a été utilisée avec 0,18 mM d'acide oléique avec le *Brij-58* comme détergent. Les bactéries ont été récoltées dans la phase exponentielle avec une  $\text{DO}_{600\text{ nm}}$  de 0,6-1,0. Les spectres ont été enregistrés sur spectromètre RMN 400 MHz avec un écho à une température de 37 °C. Les cellules intactes ont été analysées en absence et en présence d'un PAM, le MSI-78. Les auteurs ont remarqué une baisse des moments spectraux causés par le peptide. Le laboratoire a démontré que l'on pouvait se servir de la RMN du deutérium sur des cellules intactes pour faire des études membranaires et étudier le mécanisme d'action de peptides antimicrobiens. Les spectres RMN ainsi que la variation des moments spectraux sont présentés à la figure 1.7.

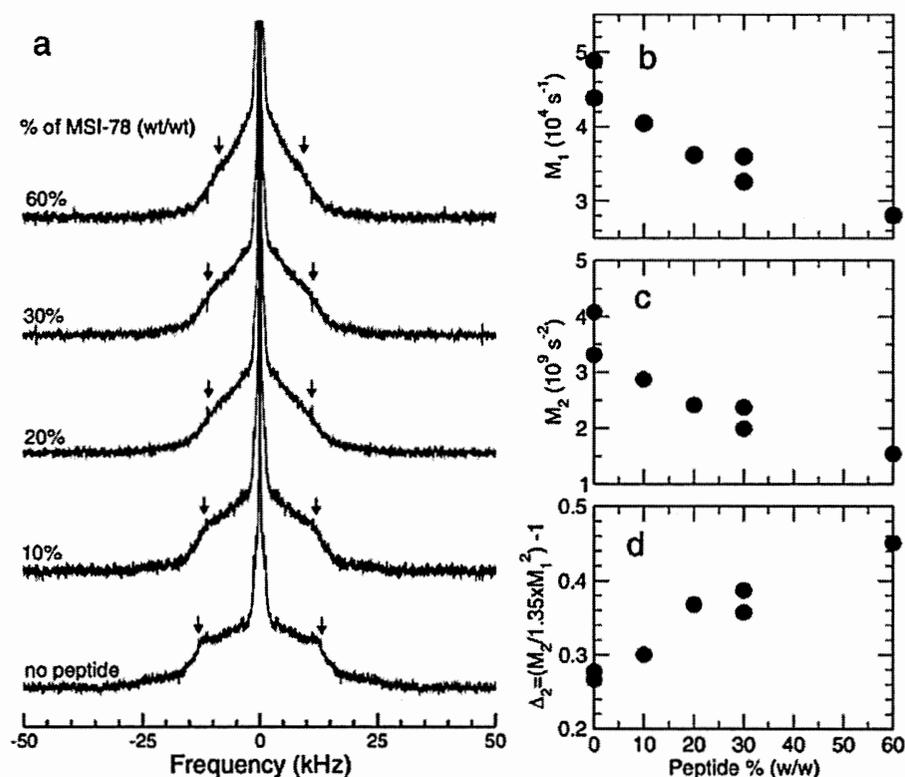


Figure 1.7 a) Spectre RMN- $^2\text{H}$  d'*E. coli* LA8 marquée à l'acide palmitique deutéré à 37°C en présence de différentes concentrations de MSI-78, b) premier moment, c) second moment, d) paramètre delta. Adaptée de [18] avec permission.

Par la suite en 2013 dans le laboratoire d'Isabelle Marcotte à l'UQAM, Catherine Tardy-Laporte a effectué un marquage d'*E. coli* avec une souche non mutée pouvant effectuer la  $\beta$ -oxydation. L'utilisation d'une souche sans mutation est un avantage qui permet son utilisation dans plusieurs laboratoires. Une concentration de PA- $\text{d}_{31}$  de 0,25 mM a été utilisée et la dodécylphosphocholine (DPC) a été employée comme détergent. L'acide oléique n'a pas été utilisé. Les bactéries ont été récoltées en fonction du temps de croissance en microplaque pour une  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,4 qui serait au milieu de la phase exponentielle. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre RMN 600 MHz avec un écho à une température de 37 °C. Les cellules intactes ont été analysées à l'aide de

moments spectraux. Les cellules ont également été mises en présence de molécules qui perturbent la membrane et les différences spectrales ont été observées. Les auteurs ont démontré que l'on pouvait se servir de la RMN du deutérium sur des cellules intactes et sans mutations pour faire des études membranaires. Les spectres sont présentés à la figure 1.8.

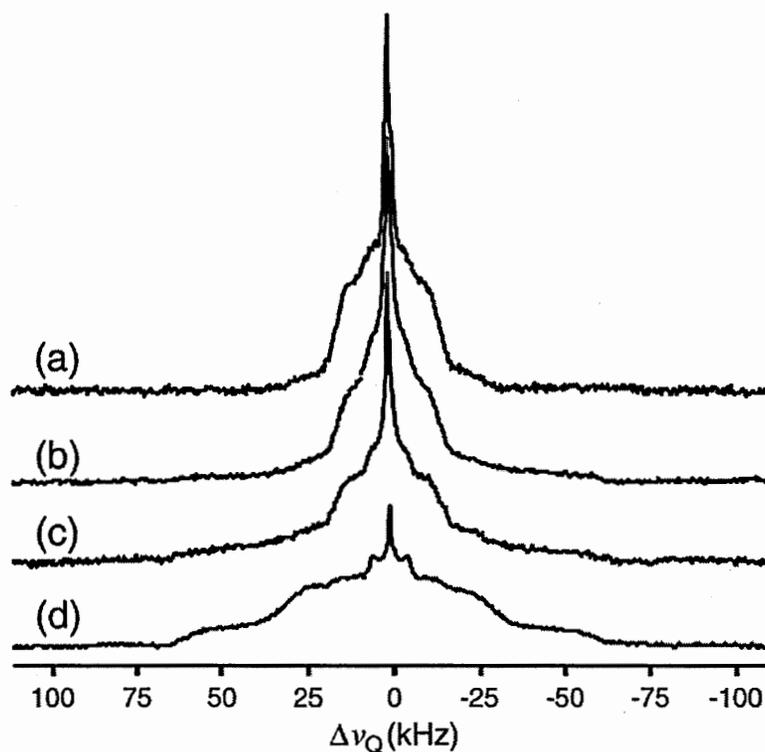


Figure 1.8 Spectre RMN- $^2\text{H}$  d'*E. coli* marquée à l'acide palmitique deutéré à 37 °C, a) cellules intactes, b) cellule en présence de polymyxine b, c) fullerenol, d) chlorure de cétyltriméthyleammonium. Adaptée de [19] avec permission.

L'équipe du laboratoire Marcotte a continué de perfectionner les techniques d'analyse en RMN *in cellulo*. En 2015, les auteurs ont prouvé que l'on pouvait se servir de la rotation à l'angle magique pour réduire le temps d'acquisition. Une concentration de PA-d<sub>31</sub> de 0,19 mM a été utilisée en combinaison avec l'acide oléique à la même concentration et la DPC a été utilisée comme détergent à 1 mM. Les bactéries ont été

récoltées en fonction du temps de croissance en microplaque pour une  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,4 qui serait au milieu de la phase exponentielle. Les spectres ont été enregistrés avec un écho quadripolaire à différentes températures avec l'utilisation de la rotation à l'angle magique à 10 kHz sur certains spectres avec un spectromètre RMN 400 MHz. Les spectres ont été analysés par leurs moments spectraux. Ces expériences ont permis de réduire le temps d'acquisition d'un facteur 10. Réduire le temps d'expérience est avantageux pour travailler en condition *in vivo*. Les spectres sont présentés à la figure 1.9.

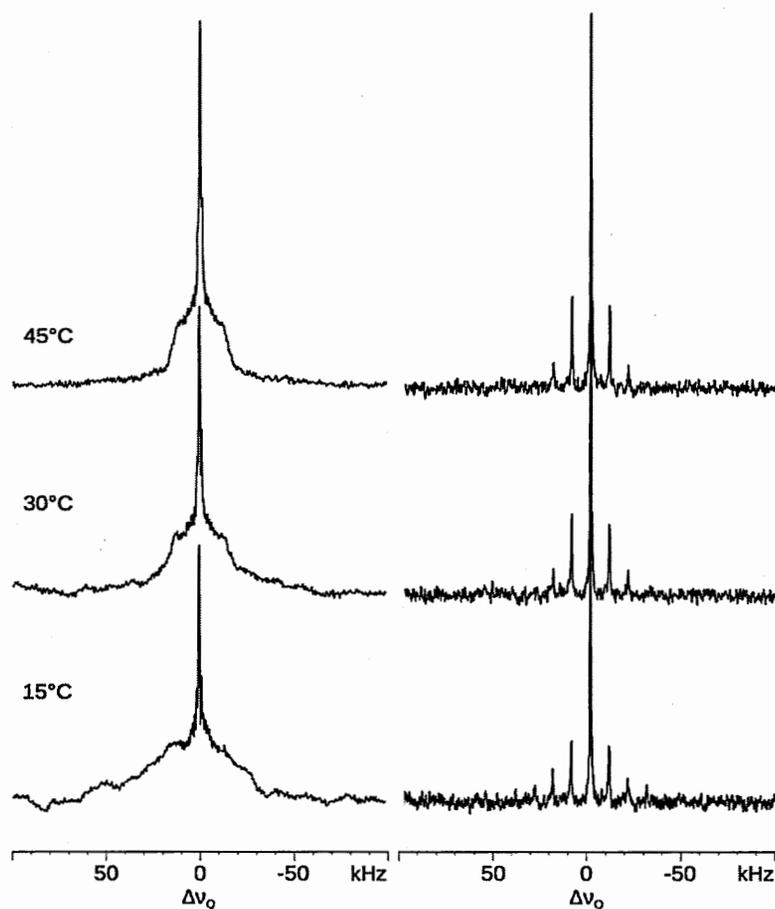


Figure 1.9 Spectre RMN- $^2\text{H}$  d'*E. coli* marquée à l'acide palmitique deutéré à différentes températures, à gauche en mode statique et à droite avec rotation à l'angle magique. Adaptée de [15] avec permission.

### 1.3.3 Membrane de microalgues (*C. reinhardtii*)

Les techniques utilisées pour analyser les membranes des bactéries peuvent également être efficaces pour les microalgues. Comme présenté par Zhao *et al.* [20], des techniques de cytométrie en flux couplée avec l'utilisation de fluorophores comme le *SYTOX Green* permet d'analyser le cytosol de microalgues qui ont une membrane lysée. Des techniques de polarisation de la fluorescence avec l'utilisation d'une sonde 1,6-diphényle-1,3,5-hexatriène (DPH) peuvent être utilisées pour analyser la polarisation de la membrane qui peut être corrélée à la fluidité membranaire. Cette dernière technique a été utilisée pour la première fois sur *C. reinhardtii* en 2016. La membrane peut également être analysée par microscopie électronique à transmission sur des coupes de la cellule. Les sondes sont présentées à la figure 1.10.

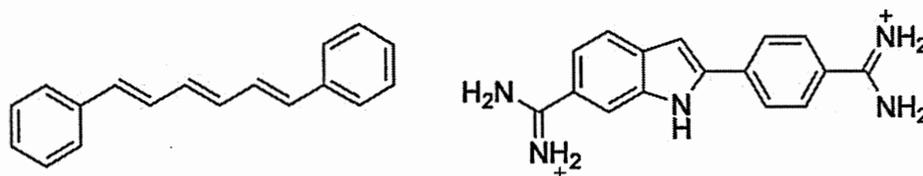


Figure 1.10 Structure moléculaire du 1,6-diphényle-1,3,5-hexatriène (DPH) et du *SYTOX Green*.

Plusieurs contaminants marins peuvent avoir une nature hydrophobe ou amphiphile et donc avoir une affinité pour les membranes. Il serait intéressant d'étudier les perturbations de la membrane des microalgues causées notamment par les retardateurs de flamme ainsi que par les HAP. En effet, comme présenté par Debenest *et al.* [21], les retardateurs de flamme sont des contaminants émergents qui sont, entre autre, utilisés dans l'industrie du plastique, textile et électronique. Ils sont utilisés pour ralentir la propagation des flammes, mais exercent un effet néfaste sur l'environnement. Les polybromodiphényléthers (PBDE) sont les premiers à avoir été utilisés et ont été substitués à cause de leurs effets toxiques et persistants sur les écosystèmes aquatiques. Le tétrabromobisphénol A (TBBPA) est maintenant utilisé. Malheureusement, même

de très faibles concentrations ( $< 1$  ppm) de cette dernière molécule causent une inhibition de croissance sur *C. reinhardtii*. La structure moléculaire de ces retardateurs de flamme est présentée à la figure 1.11.

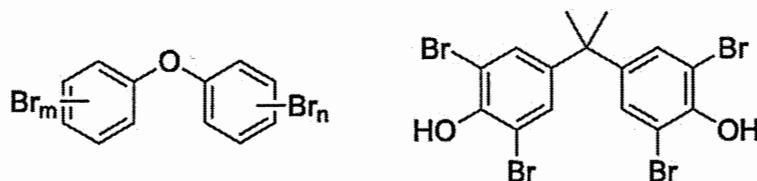


Figure 1.11 Structure moléculaire du polybromodiphényléther (PBDE) et du tétraboromobisphénol A (TBBPA).

Comme présenté par Aksmann *et al.* [22], les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants hydrophobes qui absorbent l'énergie lumineuse et peuvent relâcher des espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'anthracène peut nuire au photosystème II dans la chaîne de transport des électrons des quinones de *C. reinhardtii*, ce qui pourrait être causé par l'insertion de cette molécule dans les membranes des thylakoïdes et nuirait d'un point de vue structural à la machinerie photosynthétique. Comme présenté à la figure 1.12, l'anthracène avec une longueur de chaîne de 7 carbones peut s'insérer entre les chaînes acyles des lipides polaires de 14 à 18 carbones.

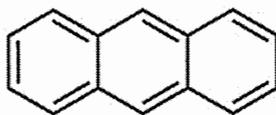


Figure 1.12 Structure moléculaire de l'anthracène.

La dynamique de la membrane (majoritairement des thylakoïdes) peut être analysée par RMN du carbone-13 ( $^{13}\text{C}$ ) sur des cellules entièrement marquées comme présenté par Azadi-Chegeni *et al.* [23]. Cette technique est en cours de développement avec l'utilisation de filtres comme la polarisation croisée (CP) et l'*Insensitive Nuclei*

*Enhanced by Polarization Transfer* (INEPT). La CP favorise l'observation de régions rigides, et l'INEPT, de régions mobiles [24]. Les lipides fluides peuvent donc être facilement filtrés. L'effet de la température sur les lipides ainsi que sur les positions sur les chaînes acyles peut être révélé grâce à ces filtres de dynamique.

Comme pour les bactéries, le marquage sélectif de la membrane avec des lipides deutérés permettrait d'avoir un unique signal de lipides à traiter, sans avoir besoin d'utiliser des filtres dynamiques. L'analyse des moments de spectre RMN du deutérium est déjà reconnue dans la littérature [8] et pourrait donc nous informer sur la dynamique générale des lipides de la microalgue. De plus, l'utilisation de lipides deutérés pour sonder la membrane n'est *à priori* pas susceptible d'altérer la fluidité membranaire comme avec l'utilisation du DPH. Suivant les bactéries, l'utilisation de lipides deutérés pour analyser les membranes des microalgues est une technique innovatrice.

#### 1.4 Projet - Marquage endogène

L'approche générale pour analyser les chaînes acyles des membranes cellulaires par RMN consiste à fournir un lipide exogène deutéré comme sonde [8]. Dans le cas des bactéries, l'acide gras le plus utilisé, et le moins dispendieux, est le PA-d<sub>31</sub>. Cet acide gras est utilisé par la machinerie cellulaire (tel que décrit à la section 1.6.3), puis il est inséré dans un phospholipide de la membrane. Par contre, le marquage exogène altère le profil d'acides gras natif du microorganisme. Par exemple, le ratio d'acides gras saturés/insaturés est naturellement de 1 et peut augmenter à 1,5 suite au marquage. Afin de préserver le ratio lipidique, de l'acide oléique froid est donc également fourni [15, 17].

L'approche proposée dans ce projet consiste à utiliser des lipides endogènes, c'est-à-dire que le microorganisme sera marqué à partir d'acides gras produits par le même microorganisme entièrement marqué. Cette approche, permettra d'offrir au microorganisme en question, tout ce dont il a besoin pour obtenir une membrane saine et marquée tout en maintenant un profil d'acides gras naturel. La différence entre les marquages exogène et endogène est présentée à la figure 1.13 pour les bactéries.

La même approche est également proposée pour les microalgues. Il est à noter qu'aucun marquage de lipides deutérés n'est répertorié dans la littérature pour *C. reinhardtii*. Par contre, les acides gras sont toxiques pour les microalgues [25]. Elles ont donc besoin de lipides avec une tête polaire. Les lipides seront donc simplement extraits sans être saponifiés.

Afin de réduire les coûts pour la production de lipides endogènes, de l'eau lourde à 70 % contenant un milieu de culture avec un sucre froid a été utilisée pour les bactéries. Le marquage des microalgues peut se faire dans un milieu autotrophe avec de l'eau lourde à 50 %. Ces conditions de marquages intermédiaires de microorganismes en entier offrent un court temps d'adaptation à l'effet toxique du deutérium. Afin de rentabiliser la production de lipides, l'eau lourde peut être récupérée pour des marquages ultérieurs.

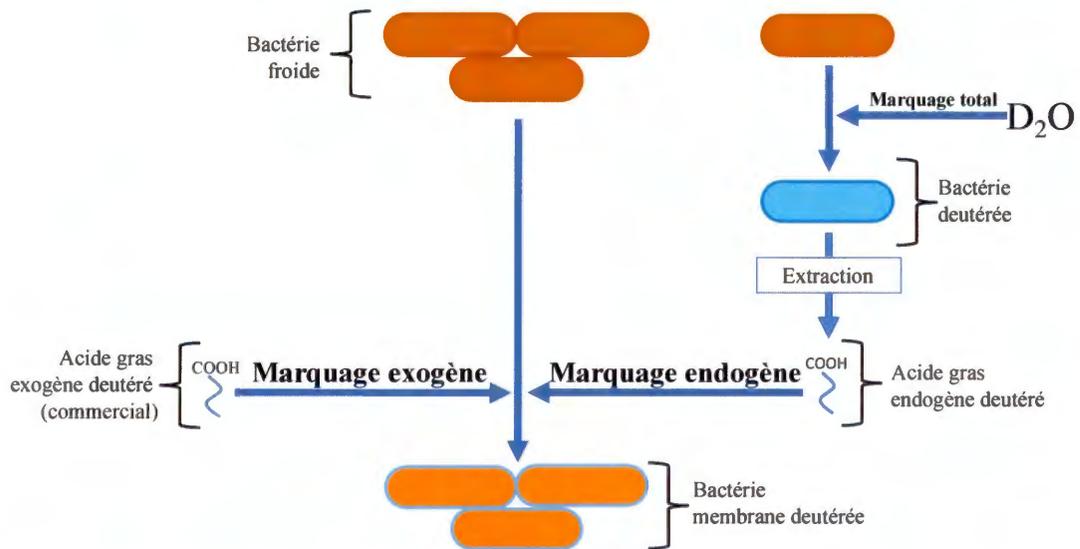


Figure 1.13 Schématisation des marquages exogène et endogène.

#### 1.4.1 Objectifs et approches

L'objectif principal de ce projet est d'effectuer un marquage au moyen de lipides endogènes sur deux microorganismes, soit *E. coli* et *C. reinhardtii*, et d'en évaluer ses bénéfices par rapport au marquage avec les lipides exogènes.

Pour ce faire, les conditions de marquage idéales avec l'utilisation de lipides exogènes ont été optimisées à partir de celle de la littérature [14, 15, 19]. Les paramètres peuvent inclure la concentration de lipides deutérés utilisée, leur nature, leur solubilisation ainsi que la phase de croissance du microorganisme et de son milieu de culture.

Par la suite, les microorganismes ont été cultivés dans l'eau lourde partiellement deutérée dans un milieu minimal pour les marquer en entier, pour ensuite en extraire leurs lipides, soit les lipides endogènes. Les conditions idéales pour la deuteration des microorganismes en entier ont également été établies à partir de la littérature [26-29]

ainsi qu'expérimentalement. Soit le milieu de culture ainsi que le taux de deutération et son apport en carbone organique. La méthode d'extraction des lipides a également été optimisée à partir de méthodologies proposées dans la littérature [30, 31].

Finalement le marquage avec les lipides endogènes a été effectué et une comparaison avec les lipides exogènes a été effectuée. La comparaison porte sur le profil d'acides gras évalué par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), sur la fluidité membranaire par la RMN-<sup>2</sup>H analysée par le second moment, et sur la viabilité cellulaire.

#### 1.4.2 Structure du document

Les deux prochaines sections de ce chapitre, *i.e.* 1.5 et 1.6, portent sur les microorganismes modèles utilisées, soit respectivement *E. coli* et *C. reinhardtii*. Les sections décrivent brièvement les microorganismes et en particulier leurs parois ainsi que leurs membranes. Une attention particulière est apportée aux lipides qui composent la membrane, sur la nature des têtes polaires ainsi que sur les chaînes d'acides gras.

Le chapitre II de la méthodologie présente tous les aspects techniques de la méthodologie qui ont permis d'effectuer la comparaison entre les marquages exogène et endogène sur les deux microorganismes. Les étapes du développement méthodologique y sont également présentées. La première section porte sur la culture des bactéries dans un milieu entièrement deutéré, l'extraction et la préparation des lipides endogènes, le marquage avec les lipides exogènes ou endogènes ainsi que le test de viabilité cellulaire. La deuxième section porte sur les mêmes derniers points pour les microalgues. Les sections 2.3 et 2.4 portent sur l'analyse des microorganismes

marqués respectivement par GC-MS et RMN. La section 2.5 présente la théorie simplifiée de la RMN du deutérium.

Le chapitre III porte sur les résultats directement discutés de manière continue en trois sections où une synthèse est effectuée à la fin de chaque section. La section 3.1 porte sur l'optimisation du marquage exogène pour *E. coli* alors que la section 3.2 porte sur la comparaison entre les marquages exogène et endogène. Les lipides endogènes sont également caractérisés dans cette section. La section 3.2 porte directement sur la comparaison entre les deux types de marquages de *C. reinhardtii*. L'optimisation du marquage est présentée en annexe D.

Une conclusion est finalement présentée en effectuant un retour sur chaque objectif ainsi que les données les plus importantes notées lors de la comparaison des marquages exogène et endogène de chaque microorganisme. Les perspectives sur la technique de marquage et d'analyse RMN sont également présentées pour la continuation du projet.

Des annexes sont utilisées pour présenter respectivement des protocoles simplifiés de la méthodologie, des données supplémentaires, des expériences supplémentaires effectuées sur *E. coli* ainsi que le marquage au moyen de lipides exogènes naturels pour les microalgues.

### 1.5 *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* a été choisie, car elle est bien documentée [32, 33]. C'est un excellent modèle comme bactérie à *Gram* (-). Elle est représentée à la figure 1.14. Elle est anaérobie facultative et possède des flagelles. Elle se cultive bien en laboratoire, mais peut aussi se retrouver dans les eaux ainsi qu'en grande concentration dans notre

colon. Elle est la bactérie prédominante de la de matière fécale, nous pouvons retrouver de  $10^7$  à  $10^9$  unités formatrices de colonies (UFC) par gramme. Elle réside et se nourrit dans le mucus qui recouvre les cellules épithéliales du gros intestin. Chez les individus sains, la bactérie a une relation commensale avec son hôte, c'est-à-dire que nous lui apportons un environnement propice, et que nous bénéficions peu de sa présence.



Figure 1.14 Souche d'*E. coli* de catégorie entérotoxigénique avec *fimbriae*. Adaptée de [33] avec permission.

### 1.5.1 Paroi

La paroi d'*E. coli* est divisée en trois couches (Fig. 1.15) [8]. Elle est tout d'abord composée d'une membrane interne en bicouche lipidique composée de phospholipides. La membrane interne a une épaisseur de 4 nm [34]. La zone entre les deux membranes s'appelle le périplasme et mesure 14 nm [34]. Une fine couche de peptidoglycane de 6-8 nm d'épaisseur réside dans le périplasme [8]. Le peptidoglycane est un polymère de glycoaminopeptide rigide constitué en unités linéaires en liaison  $\beta(1-4)$  de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique qui est réticulé par des peptides sur les résidus lactates [35]. La membrane externe est une bicouche lipidique fortement

asymétrique. Elle a une épaisseur de 20 nm qui est engendrée par les lipopolysaccharides (LPS) sur la monocouche externe [34].

Tel que présenté par Clifton *et al.* et Silipo *et al.* [34, 36], les LPS sont composés d'une partie hydrophobe (lipide A) qui sont liés à une chaîne de sucre phosphorylé (hydrophile) sur laquelle est rattachée une autre section d'oligosaccharide (*core*) suivie d'une dernière région spécifique d'antigène (*antigène-o*) de polysaccharide. Ils ont une charge négative et sont stabilisés par des ions divalents. Le caractère amphiphile de ce polymère offre une protection à la bactérie. Les seuls nutriments à pénétrer utilisent donc des protéines de transport. Les protéines membranaires sont donc également présentes dans les deux membranes et ne sont pas représentées sur la figure 1.15.

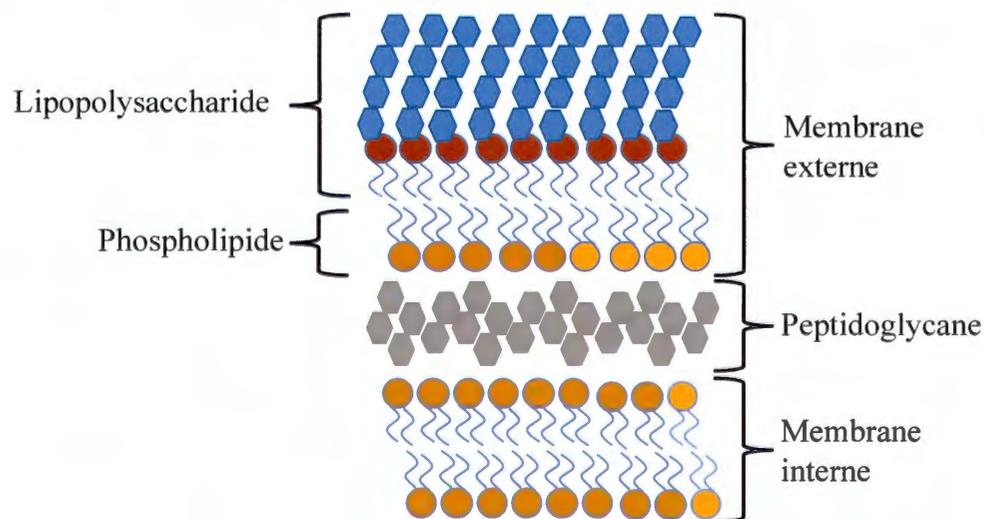


Figure 1.15 Représentation simplifiée de la paroi d'*E. coli*, inspiré de [8, 34].

### 1.5.2 Lipide

Comme présenté par Booth *et al.* [8] et résumé dans le tableau 1.1, le lipide le plus abondant retrouvé chez *E. coli* est la phosphatidyléthanolamine (PE). Ce phospholipide est zwitterionique. La membrane de la bactérie a une charge négative qui provient du phosphatidylglycérol (PG) ainsi que de la cardiolipine (PC). Le lipide A retrouvé dans

le LPS ainsi que ses chaînes d'acides gras ne seront pas traitées dans ce document. Les têtes polaires sont représentées dans la figure 1.16.

Tableau 1.1 Proportion relative des principales têtes polaires retrouvées chez *E. coli* et lipide A. Compilation de données [8, 36, 37].

Classe	Lipide	(%)
Phospholipide	Phosphatidyléthanolamine (PE)	70 - 80
	Phosphatidylglycérol (PG)	15 - 25
	Cardiolipine (CL)	4 - 5
LPS	Lipide A (LA)	25*

\*25 % de la membrane externe

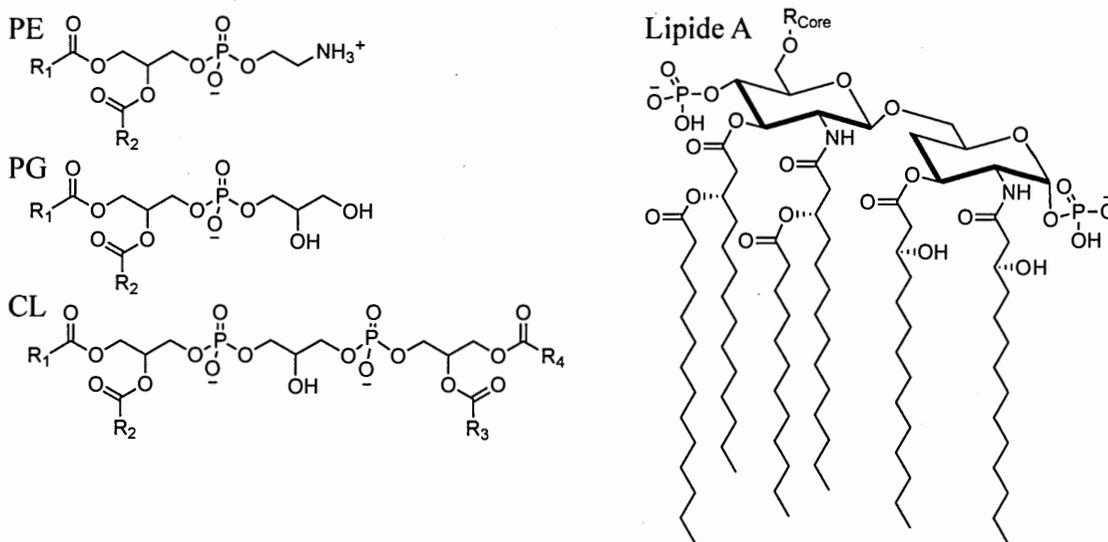


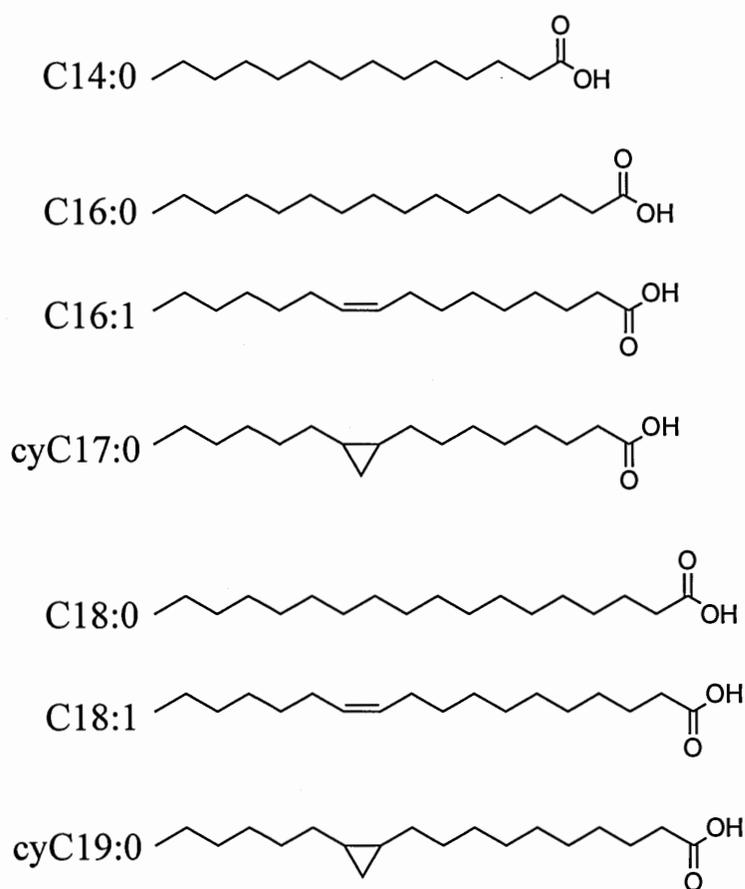
Figure 1.16 Principales têtes polaires retrouvées chez *E. coli* et lipide A [36].

Les chaînes d'acides gras les plus retrouvées dans les lipides de *E. coli* sont présentées dans le tableau 1.2 et représentées à la figure 1.17. Comme la concentration d'acides gras varie avec le stade de croissance de la bactérie, la composition n'est pas indiquée.

Tableau 1.2 Principaux acides gras retrouvés chez *E. coli*

Nom commun	GD	Notation
Acide myristique		C14:0
Acide palmitique		C16:0
Acide palmitoléique	7	C16:1
Acide cis-9,10-méthylènehexadecanoïque	7	cyC17:0
Acide stéarique		C18:0
Acide vaccénique	7	C18:1
Acide cis-9,10-méthylèneoctadecanoïque	7	cyC19:0

La notation (GD) désigne la position de l'insaturation ou du cycloproyle à partir du dernier carbone. Le nombre de carbone est indiqué et le deuxième chiffre désigne le nombre d'insaturation.

Figure 1.17 Représentation des principaux acides gras retrouvés chez *E. coli*.

Les chaînes acyles les plus observées par têtes polaires sont présentées dans le tableau 1.3. L'acide palmitique (C16:0) couplé avec un acide gras cyclopropylé (cyC17 :0) est la combinaison la plus retrouvée dans la PE et le PG (C33:1). Il est reconnu dans la littérature que les cyclopropyles s'insèrent sur les insaturations déjà présentes [38]. Il s'agit donc d'une modification des phospholipides dans la membrane. Cette modification s'effectue à la fin de la phase exponentielle. Ces cyclopropyles rendent la membrane plus résistante au pH acide.

Tableau 1.3 Chaînes acyles en fonction des têtes polaires [37]

Tête polaire	Chaînes acyles
PE	C32:1, C33:1, C34:2, C34:1, C35:1, C36:2
PG	C32:1, C33:1, C34:1
CL	N/D
LA (LPS)	C12:0, C14:0, C14:0 (3-OH)

### 1.5.3 Incorporation des acides gras

Le mécanisme d'incorporation des acides gras est déjà connu dans la littérature [39] tel que représenté à la figure 1.18. La bactérie peut économiser une quantité d'énergie importante en utilisant des acides gras exogènes disponibles dans le milieu. Elle a, en effet, un système pour les incorporer. La protéine FadL a une double action pour l'incorporation des acides gras à longue chaîne. Dans un premier lieu, les acides gras se lient à elle, puis elle les transporte au cytosol à l'aide d'autres protéines (Tsp et FACS). Un gradient de protons est également utilisé pour le transport. Une fois incorporé, l'acide gras peut être greffé sur une tête polaire ou être  $\beta$ -oxydé pour la production d'énergie.

Il est à noter que la protéine FadL n'a pas la même constante de dissociation pour les acides gras ni la même capacité de liaison [40]. En effet, la protéine FadL a une affinité d'environ 4 fois plus grande ( $2 \times 10^7$  M) pour l'acide palmitique que pour l'acide oléique. Par contre, la protéine FadL a une capacité de liaison 2,5 fois plus grande (1500 pmol/mg) pour l'acide palmitique qu'oléique.

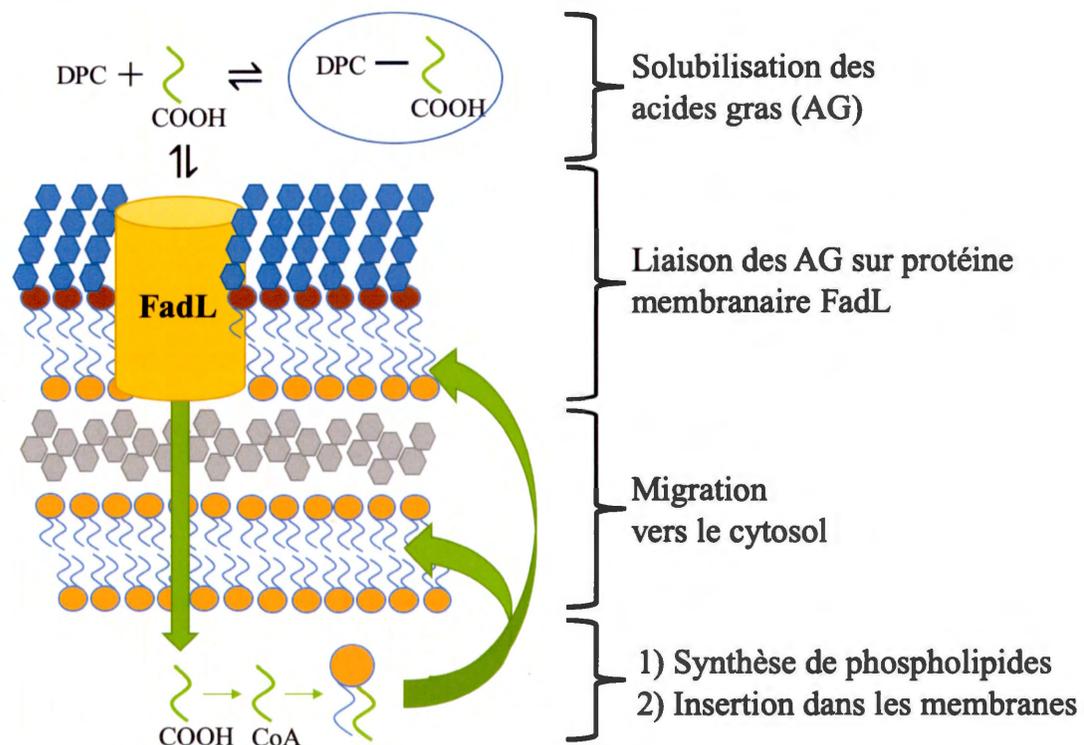


Figure 1.18 Schéma général de l'incorporation des acides gras. Adaptation de [39].

#### 1.5.4 Souche mutante

Certains mutants d'*E. coli* ont été développés afin de les empêcher de cataboliser les acides gras. Le mutant L51 incorpore les acides gras et ne peut pas effectuer la  $\beta$ -oxydation de ces derniers [17]. Il est à noter que la souche LA8 d'*E. coli* présentée de

ces références [18, 41] est une bactérie mutante auxotrophe qui ne peut pas synthétiser ses acides gras via un défaut de l'enzyme FabE. Aussi, elle ne peut pas métaboliser des acides gras via l'enzyme FadE. Lors de ces mutations, une résistance à l'ampicilline et à la kanamycine a été ajoutée à la bactérie. La mutation est thermosensible et la bactérie peut être cultivée à 30 °C, mais pas à 37 °C dans un milieu minimal. La bactérie a donc besoin d'acides gras exogènes pour avoir une croissance à 37 °C. Cela en fait donc un excellent modèle pour obtenir un taux de marquage élevé en acides gras dans le cas de la deutération des phospholipides.

#### 1.6 *Chlamydomonas reinhardtii*

Le modèle utilisé comme microorganisme photosynthétique est *Chlamydomonas reinhardtii* dans l'embranchement des *Chlorophyta*. Le genre *Chlamydomonas* a évolué depuis 400 - 500 millions d'années comme énoncé par Hoek *et al.* [42]. C'est une microalgue d'eau douce eucaryote d'environ 10 µm de diamètre. Son ADN est réparti en 17 chromosomes et elle contient également de l'ADN circulaire dans ses mitochondries ainsi que dans son chloroplaste. Elle exprime un phototaxisme grâce à la rhodopsine, un pigment photosensible aussi retrouvé chez les cellules animales. Elle se déplace grâce à ses deux flagelles. Elle régule sa pression osmotique grâce à ses vacuoles. La cellule est principalement constituée d'un immense chloroplaste en forme de tasse qui tient le noyau. On retrouve les thylakoïdes à l'intérieur du chloroplaste qui sont empilés en colonnes de 2 à 6 unités. Certains empilements peuvent aller jusqu'à 20 unités. Le dioxyde de carbone est principalement fixé près du pyrénoloïde grâce à l'enzyme Rubisco et l'énergie est conservée sous la forme de granules d'amidon. Elle peut également conserver son énergie sous forme de gouttelettes lipidiques qui peuvent être observées au microscope.

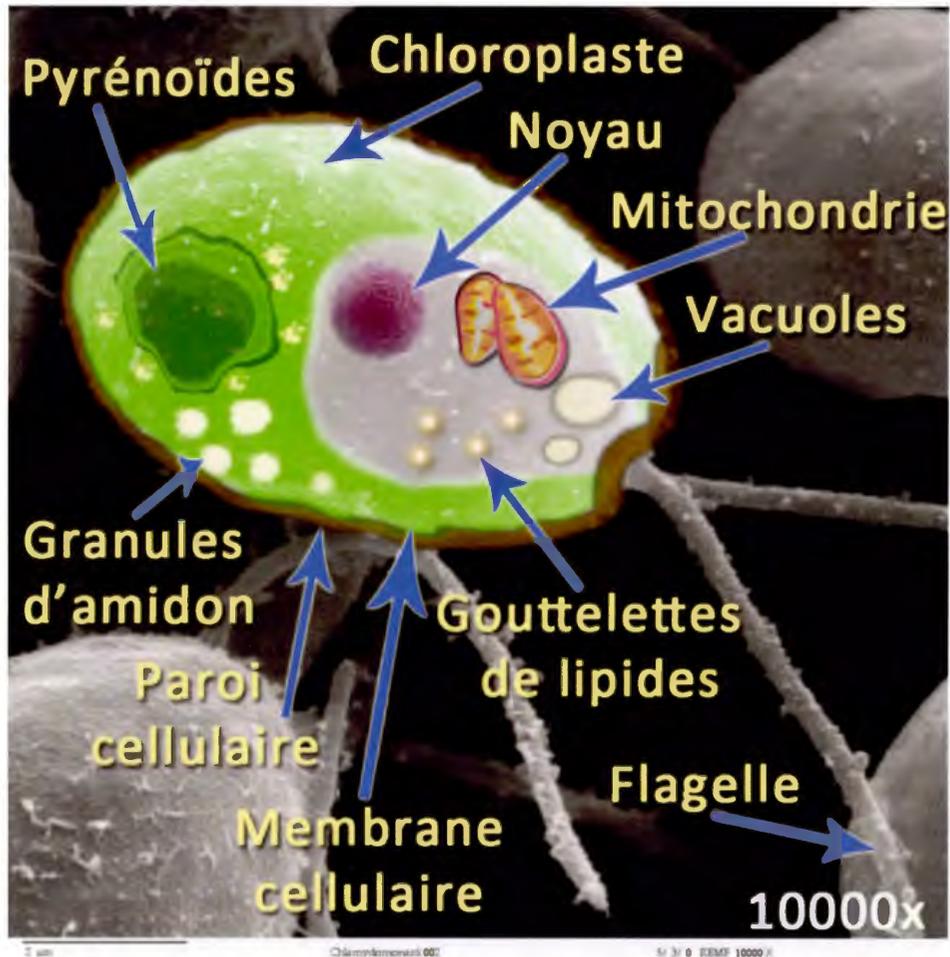


Figure 1.19 Schématisation des organelles de *Chlamydomonas reinhardtii* adaptée de [42] sur cliché de microscopie électronique à balayage sans droit d'auteur de *Dartmouth Electron Microscope Facility, Dartmouth College*.

### 1.6.1 Intérêts biotechnologiques et espèce sentinelle

*C. reinhardtii* est étudié pour la production de carburant sous forme de biodiesel ainsi que de biohydrogène [43]. Quand la microalgue est privée d'azote, elle produit une plus grande quantité de triglycérides et d'amidon. Une sélection de mutants qui produisent moins d'amidon peuvent être sélectionnés pour favoriser la production de

lipides. Lorsque la microalgue est privée de soufre, elle produit de l'hydrogène. La privation inhibe le photosystème II qui ne peut plus oxyder l'eau.

La microalgue est également utilisée comme espèce sentinelle des eaux douces. Elle est donc un modèle pour étudier l'impact de contaminants émergents comme les oxydes de graphènes mélangés aux eaux usées [44] ou les nanoparticules d'oxyde de cérium (catalyseur) [45]. La microalgue peut internaliser les contaminants et survivre sous un certain seuil de concentration. Ce seuil est inquiétant, car elle peut introduire les contaminants dans la chaîne alimentaire et des phénomènes de bioaccumulation vers les organismes supérieurs peuvent être observés.

#### 1.6.2 Paroi

La paroi cellulaire de *C. reinhardtii* est unique et est la première frontière à faire face aux contaminants d'eau douce. Elle est composée de trois unités [46]. Les deux faces externes sont composées d'un réseau fibreux fortement ordonné considéré comme cristallin, alors que l'intérieur est granuleux. La paroi est composée de glycoprotéines riches en hydroxyprolines contenant des unités de galactose, arabinose, mannose et glucose. Le réseau est probablement rattaché à la membrane avec des protéines membranaires. Des isoformes de la protéine 14-3-3 (polypeptide de réticulation de la paroi cellulaire) sont retrouvés dans la fraction microsomal des membranes de *C. reinhardtii* [47]. Une représentation de la structure de la paroi cellulaire et de la membrane est présentée à la figure 1.20.

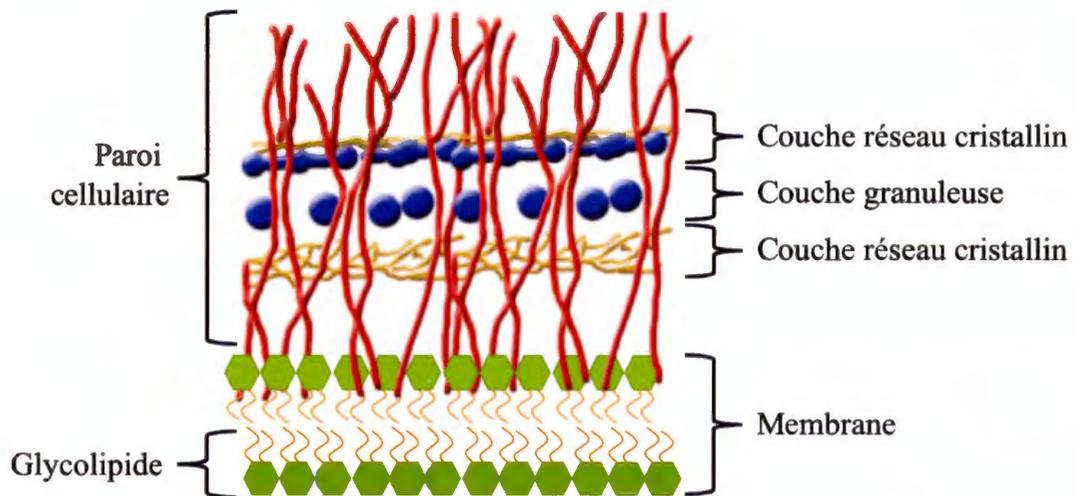


Figure 1.20 Schématisation de la paroi et de la membrane cellulaire de *C. reinhardtii*, Adaptation de [46].

### 1.6.3 Lipide

Les lipides de la membrane de *C. reinhardtii* sont présentés par Vieler *et al.* [48]. Sa membrane externe est surtout composée de glycolipides et un peu de phospholipides. La composition lipidique est semblable à celles des plantes supérieures, mais la phosphocholine est remplacée par un bêtaïne-lipide (DGTS). Le chloroplaste et ses thylakoïdes renferment 75 % des lipides de la microalgue. Le chloroplaste est constitué d'une double membrane. Chaque membrane mesure environ 5 nm et est séparée des autres par une distance de 6 à 10 nm.

Les têtes polaires des lipides de *C. reinhardtii* sont présentées dans le tableau 1.4 et représentées dans la figure 1.21.

Tableau 1.4 Principales classes de lipides polaires retrouvées chez *C. reinhardtii* et pourcentage relatif. Adaptation de [48].

Classe	Lipide	(%)
Glycérolipide	Monogalactosyl-diacylglycérol (MGDG)	38
	Digalactosyl-diacylglycérol (DGDG)	24
	Sulfoquinovosyl-diacylglycérol (SQDG)	12
Bétaïne	Diacylglyceryl-triméthylhomoserine (DGTS)	12
Phospholipide	Phosphatidylglycérol (PG)	10
	Phosphatidyléthanolamine (PE)	3
	Phosphatidylcholine (PC)	Trace

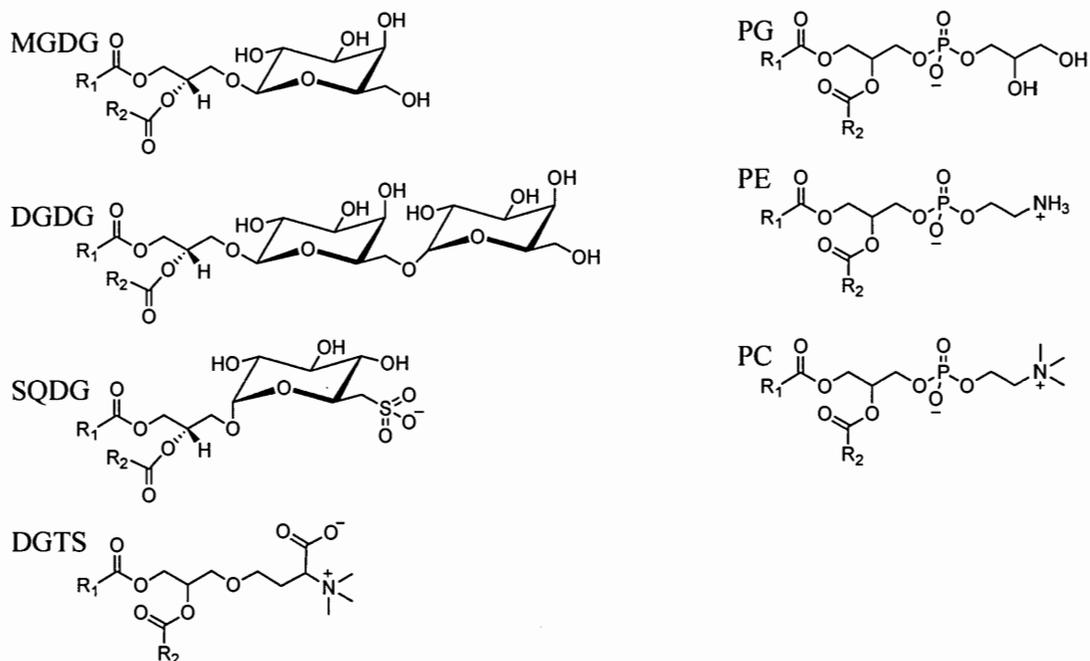


Figure 1.21 Têtes polaires des lipides retrouvées chez *C. reinhardtii*.

Les principaux acides gras à être rattachés sur la tête polaire sont présentés dans le tableau 1.5 et la figure 1.22.

Tableau 1.5 Principaux acides gras retrouvés chez *C. reinhardtii* et pourcentage relatif massique. Adaptation de [49].

Nom commun	∩	Δ	Notation	%
Acide palmitique			C16:0	32
Acide hexadécatétraénoïque	3	4,7,10,13	C16:4	10
Acide stéarique			C18:0	3
Acide oléique	9	9	C18:1	2
Acide cis-vaccénique	7	11	C18:1	5
Acide linoléique	6	9,12	C18:2	10
Acide pinoléique	6	5,9,12	C18:3	10
Acide α-linolénique	3	9,12,15	C18:3	20

La notation (∩) désigne la position de l'insaturation à partir du dernier carbone, alors que la notation (Δ) l'indique à partir du premier carbone. Le nombre de carbone est indiqué et le deuxième chiffre désigne le nombre d'insaturations.

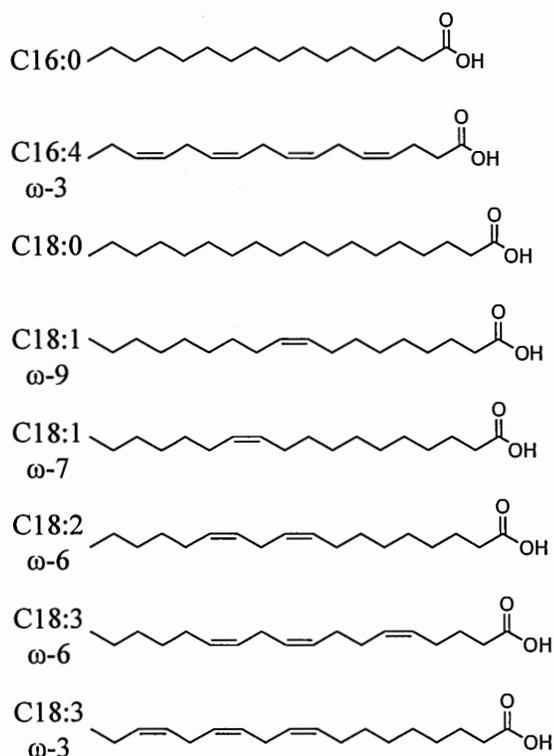


Figure 1.22 Principaux acides gras retrouvés dans les lipides de *C. reinhardtii*.

Les acides gras retrouvés par tête polaires sont présentés dans le tableau 1.6. La microalgue est ainsi composée d'une grande diversité lipidique tant sur les têtes polaires que sur les acides gras.

Tableau 1.6 Têtes polaires de *C. reinhardtii* et chaînes acyles [48]

Tête polaire	Chaîne acyle
MGDG	34:7
DGDG	34:7, 34:6, 34:3, 34:2, 34:1
SQDG	32:0
DGTS	34:3, 34:4
PG	32:1
PE	34:1, 36:3
PC	-

## CHAPITRE II

### MÉTHODOLOGIE

La première section de ce chapitre présente les protocoles pour effectuer les marquages exogènes et endogènes au deutérium de la membrane d'*E. coli* avec les analyses de viabilité cellulaire. Les étapes pour accomplir le marquage endogène, soit la deutération du microorganisme en entier, l'extraction, et la préparation des lipides deutérés, y sont également décrites. La deuxième section élabore les mêmes points pour *C. reinhardtii*. Les sections 2.3 et 2.4 sont communes aux deux microorganismes et portent sur la méthodologie et les paramètres expérimentaux pour les analyses de GC-MS et RMN. Chaque protocole utilisé a nécessité des étapes de développement et d'optimisation méthodologiques qui sont parfois présentées avec une police de caractère réduite. Lorsque mentionnés, les protocoles détaillés sont disponibles en annexe. Les principales notions de la théorie de la RMN du deutérium sont résumées à la section 2.5.

## 2.1 Protocoles de marquage au deutérium pour *Escherichia coli*

Les paramètres de culture de la bactérie pour la congélation, la deutération en milieu minimal ainsi que pour les marquages (exogène et endogène) avec la viabilité cellulaire (réactif MTT) sont présentés dans cette section. L'extraction des lipides de la bactérie entièrement deutérée à haut rendement et leur saponification sont aussi décrites.

### 2.1.1 Matériel et méthode

La souche *E. coli* BL21 provient de l'Université de Montréal (Laboratoire de la professeur Catherine Paradis-Bleau). L'acide palmitique perdeutééré (PA-d<sub>31</sub>) ainsi que l'eau lourde à 70% (v/v) (D<sub>2</sub>O) proviennent de *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.* (Andover, MA, USA). L'acide oléique (OA) froid, l'eau déplétée en deutérium ainsi que le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) proviennent de chez *Sigma-Aldrich* (Oakville, ON, Canada). La dodécylphosphocholine (DPC) provient de *Anatrace Products, LLC* (Maumee, OH, USA). Les autres produits utilisés sont du magasin de chimie de l'UQAM. L'eau utilisée pour réaliser les solutions est nanopure provenant d'eau distillée puis purifiée par osmose inversée. Les solvants organiques utilisés sont de grade HPLC ou supérieur.

Les manipulations sont toujours effectuées avec du matériel stérile à usage unique ou autoclavé. Les solutions utilisées pour les cultures et les lavages sont stérilisées par l'autoclave ou par filtration à 0,20 µm. Les manipulations sont effectuées en milieu stérile autour d'une flamme ou dans une hotte à flux laminaire.

La densité optique (DO) est toujours effectuée en mesurant l'absorbance avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm suite à une dilution (1/10) dans le milieu de culture. Le blanc est alors effectué pour chaque lecture avec une cuvette jetable en plastique de 1 mL avec 900 µL de milieu de culture qui est ensuite complété

avec 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon à analyser bien homogénéisé avec une micropipette de 1000  $\mu\text{L}$  (aspirations va-et-viens). Un facteur de dilution de 10 est appliqué sur les lectures. Des turbulences affectant la DO peuvent survenir suite à l'homogénéisation des solutions à différentes températures. La mesure est alors acceptée quand deux lectures sont stables (parfois environ 30 secondes d'équilibration sont nécessaires).

### 2.1.2 Inoculum et contrôle de la qualité de la souche bactérienne

Un protocole simplifié est présenté en annexe A.1, soit la préparation du milieu de culture et des géloses ainsi que la méthodologie de congélation.

#### 2.1.2.1 Milieu de culture et gélose

Le milieu de culture *Luria Bertani, Miller* (LB) [50] est préparé comme suit : 10 g/L peptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L d'extrait de levure équilibré à pH  $7,1 \pm 0,1$  avec une solution de HCl 10 % (m/m) ou de NaOH à 10 % (m/v) avec un pH-mètre en agitation continue (barreau magnétique). Le pH-mètre est calibré quotidiennement avec deux solutions tampons fraîches (3 mois) pH 7 et pH 10. Le milieu est ensuite autoclavé et conservé pendant 1 mois à la température de la pièce.

Les géloses LB sont réalisées en ajoutant 15 g/L d'agar. Les géloses sont préparées en versant la solution autoclavée refroidie à une température tolérable pour le manipulateur dans une hotte à flux laminaire dans des pétris en plastique stérile. Les géloses sont alors refroidies et figées avant d'être fermées ainsi que scellées avec un film de parafilm. Elles sont conservées à 4 °C pendant 1 mois.

Les géloses éosine et bleu de méthylène (EMB) [50] sont préparées en dissolvant dans le peptone à 10 g/L, le lactose 10 g/L et le  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2g/L. Le pH est ajusté à  $7,1 \pm 0,2$  et l'agar est ajouté à 15 g/L. Le bleu de méthylène à 65 ppm est prédissout avant d'être

ajouté à la solution avec l'éosine Y à 400 ppm dans un petit volume à l'aide du bain à sonication et du vortex. Le mélange est autoclavé. Une fois refroidie, mais avant la gélification, la solution est fortement agitée pour réoxyder le bleu de méthylène qui retrouvera sa couleur. Les géloses sont coulées et conservées comme précédemment. Ce milieu est sélectif pour les bactéries à *Gram* (-) et la forte fermentation de lactose produit un reflet vert métallique propre à *E. coli*.

#### 2.1.2.2 Méthodologie de congélation (inoculum)

Une gélose LB est inoculée près de la flamme par striation en cadran afin d'obtenir des colonies isolées d'*E. coli*. Le pétri est incubé à 37 °C pendant 16 à 24 h. Trois à cinq colonies bien isolées sont transférées avec un manche de *Koch* (stérilisé sous la flamme puis refroidi) dans un tube conique de 50 mL avec 5 mL de LB. Le tube est fermé et un film de paraffine est ajouté. Le tube est incubé à 37 °C, 220 rpm pendant environ 3 à 4 h. Lorsqu'une DO de 1 à 1,5 est obtenue, 3 mL sont transférés dans un second tube et 1 mL d'une solution stérile de glycérol 50 % (v/v) (19 g de glycérol autoclavé, puis dilué avec 15 mL de LB) est ajoutée. La solution est vortexée, puis transférée dans des tubes de 1,5 mL stériles à raison de 200 µL/tube dans une hotte à flux laminaire. Les tubes refermés sont plongés dans l'azote liquide dans un délai de 15 à 30 minutes suivant l'ajout de glycérol. Les tubes sont par la suite conservés à -80 °C.

Un tube est décongelé et inoculé par striation sur un agar LB et EMB comme contrôle de la qualité. Les colonies isolées doivent être rondes et blanches sur le LB et noires avec reflets métalliques sur EMB.

### 2.1.3 Culture de bactéries entièrement deutérées

Un protocole simplifié est présenté en annexe A.2. La première étape pour produire des lipides deutérés d'*E. coli* consiste à cultiver la bactérie dans de l'eau lourde. Les milieux de cultures utilisées ainsi que le processus d'acclimatation sont présentés dans les deux prochaines sous-sections. Il est à noter que dans le cadre de ce projet, il n'est pas nécessaire d'obtenir des acides gras perdeutérés à 100 %. Donc de l'eau lourde à 70 % (v/v) ainsi qu'un sucre froid peuvent être utilisés, ce qui permet de réduire les coûts de la méthode. Les milieux de culture minimaux sont utilisés pour limiter les sources de carbones organiques. Comme présenté par Cronan *et al.* [51], la biosynthèse des acides gras s'effectue avec des cycles d'élongation de deux carbones à la fois en quatre étapes. Deux étapes consistent à la réduction des intermédiaires avec les enzymes FabG et FabI. Ces deux enzymes utilisent un proton du solvant ainsi que leur coenzyme respectif, soit la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH) et la nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH). Les bactéries cultivées dans l'eau lourde inséreront donc des deutérons dans les chaînes acyles à partir du solvant et de la réduction de ces coenzymes.

#### 2.1.3.1 Milieu de culture

La culture de bactéries a été testée dans deux milieux minimaux. Un volume de milieu de culture de 10-15 % de l'erenmeyer de 1 L est utilisé dans un incubateur classique à 37 °C avec une agitation circulaire à 220 rpm. Le milieu haute densité cellulaire (HCD) [28] ainsi que le milieu *Lemaster and Richards* (LR) [29] ont été comparés avec du glycérol à 0,5 % (m/v) [26]. Dans la phase stationnaire, le milieu HCD a permis d'obtenir une DO de 1,8 alors que le milieu LR a permis d'obtenir une DO de 3,8. Le milieu LR a donc été choisi.

Les bactéries sont donc cultivées dans le milieu minimal *LeMaster and Richards* (LR), composé de deux solutions stock autoclavées [29]:

- Tampon sel 10 x:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  24 g/L neutralisé à pH 7 avec NaOH
- Sels minéraux 100 x:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,675 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,265 g/L;  
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3 mg/L et  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10  $\mu\text{L/L}$

Le glycérol protoné est utilisé comme source de carbone à 0,5 % (m/v) [26]. Le volume des solutions stocks et la masse de glycérol nécessaire à la reconstitution du milieu de culture ont été lyophilisés avant d'être reconstitués dans le  $\text{D}_2\text{O}$  70 %. Avant d'ajouter tout le volume aqueux, le pH est équilibré à 7,0 pour le milieu  $\text{H}_2\text{O}$  et à 6,75 pour le milieu  $\text{D}_2\text{O}$  70%. Une solution de HCl 37 % (m/m) diluée à 10 % dans le  $\text{D}_2\text{O}$  70 % est utilisée ainsi qu'une solution de NaOH à 10 % (m/v) dans le  $\text{D}_2\text{O}$  70 %. Les solutions reconstituées sont filtrées stérilement à 0,20  $\mu\text{m}$ . Le volume de milieu de culture est de 8 à 15 % celui de l'erenmeyer utilisé. Les cultures sont incubées à 37 °C avec une agitation de 220 rpm. Toutes les générations sont étalées sur agar LB et EMB comme contrôle de qualité.

Afin d'obtenir un meilleur rendement, une culture à haute densité cellulaire a été évaluée. Pour ce faire, un prototype de biofermenteur improvisé a été testé avec de l'eau protonée. Aussi, milieu de culture minimal spécialement conçu pour les cultures à haute densité cellulaires (HCD) a été utilisé [28]. Ce milieu comporte une plus grande source d'ammonium que le milieu minimal classique. Dans un erlenmeyer de 4 L, les bactéries ont été inoculées à une densité optique (DO) de 0,1 avec du glycérol comme source de carbone dans le milieu de culture HCD. Faute de matériel, les bactéries ont été cultivées à la température de la pièce. Le pH a été maintenu à 6,9 au moyen d'un titrateur automatique (785 DMP Titrino, Metrohm) avec une solution de NaOH 10 %. De l'air filtré à 0,20 µm était également injecté dans le milieu de culture de manière continue pour garder une culture en mode aérobie. La culture était vigoureusement agitée avec un barreau magnétique. Des injections d'une solution de glycérol filtrée ont été effectuées lorsque la DO plafonnait. Après 5 jours, une DO de 8,0 a été obtenue. Une DO de 14 est citée dans la littérature [28] avec un temps de croissance plus rapide. Le projet a été écarté car le profil d'acides gras des bactéries change avec la température et que ce montage était à risque de contaminations.

#### 2.1.3.2 Acclimatation et culture

Afin d'acclimater les bactéries avec l'eau lourde, un protocole de production d'acides aminés marqués a été adapté [52]. En résumé, la première étape consiste à acclimater les bactéries au milieu minimal froid. Par la suite, les bactéries sont inoculées dans le milieu aqueux deutéré à 70 %. Le processus d'acclimatation est effectué en deux générations dans un petit volume avant d'obtenir une croissance rapide selon Tugarinov *et al.* [52]. La troisième génération est cultivée dans un plus grand volume et est récoltée en phase plateau. Une période de 4 jours est nécessaire entre le début de l'acclimatation et la récolte de la troisième génération. Un exemple d'horaire de culture est également décrit en annexe A.2.

Les paramètres de cultures et de récolte de chaque génération ainsi que les DO attendues avec une estimation de la durée d'incubation sont présentés dans les prochains points.

- Génération 1

Une préculture d'*E. coli* est effectuée pendant 16-18 h (100  $\mu$ L d'inoculum (voir section 2.1.2) dans 100 mL de LB dans un erlenmeyer de 500 mL). La culture est rafraîchie (resuspendue par dilution) dans 5 mL de milieu LB pour une DO de 0,1 dans un conique de 50 mL. Arrivé à une DO de 0,7-0,8 (~1,5 h), les cellules sont centrifugées à 1200 g pendant 3 minutes. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 40 mL de milieu LR H<sub>2</sub>O dans un erlenmeyer de 500 mL. Les cellules sont incubées jusqu'à une DO de 0,7-0,8 (~4 h). Le volume de cellules pour obtenir 25 mL à une DO de 0,1 est centrifugé dans les mêmes conditions. Les cellules sont alors resuspendues dans 25 mL de milieu LR D<sub>2</sub>O 70 % et incubées 17-18 h dans les mêmes conditions dans un erlenmeyer de 250 mL. Suite à ces manipulations, une DO de ~4,5 est attendue.

- Génération 2

Un volume provenant de la génération 1 est resuspendu par dilution pour obtenir une DO de 0,1 avec un volume final de 40 mL de LR D<sub>2</sub>O 70 % dans un erlenmeyer de 500 mL. Après une incubation de 7-8 h une DO de ~2 est attendue.

- Génération 3

Le volume de la génération 2 nécessaire pour obtenir 400 mL à une DO de 0,1 est centrifugé. Les cellules sont resuspendues dans 400 mL de LR D<sub>2</sub>O 70 % et des volumes ~133 mL sont transférés dans trois erlenmeyers de 1 L pour la suite des manipulations. Les cultures sont incubées pendant 17-18 h. Une DO de 3,5-4 est attendue. Les cellules sont centrifugées à 4500 g pendant 15 minutes ainsi que rincées deux fois avec une saline 0,85 % (m/v), puis lyophilisées. Une masse de bactéries lyophilisées de 1,4 g/L est attendue. Les bactéries lyophilisées se conservent bien au congélateur avant d'en extraire leurs lipides. Un exemple d'horaire est présenté en annexe A.3.

#### 2.1.4 Extraction lipidique à haut rendement (Bactérie)

Plusieurs techniques d'extraction lipidiques ont été testées pour trouver la plus appropriée pour les bactéries. Pour l'optimisation du protocole d'extraction de lipides, les bactéries utilisées proviennent du même lot produit avec fermenteur improvisé avec le milieu HCD. La section 2.1.4.1 présente trois méthodes d'extraction de lipides et la section 2.1.4.2 détaille le protocole retenu qui est également disponible en version simplifiée en annexe A.3. La vaisselle utilisée est lavée trois fois avec le mélange de solvant utilisé.

##### 2.1.4.1 Protocoles d'extraction de lipides évalués

Voici les trois protocoles d'extraction de lipides qui ont été évalués afin de produire le protocole utilisé à la section 2.1.4.2.

- Adaptation de *Folch* [30, 31]:

Ce protocole a été initialement développé pour les microalgues. Les cellules fraîches sont placées dans un mélange de dichlorométhane et de méthanol dans un ratio volumique 2:1 (dichlorométhane-méthanol). Le dichlorométhane est choisi car il est moins toxique et aussi efficace que le chloroforme. Les cellules sont soniquées dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes sur glace. Puis elles sont transférées dans une ampoule à décanter et une solution de chlorure de potassium (KCl) à 0,88 % (m/v) est ajoutée dans un ratio volumique total de solvant de 2:1:0,8 (dichlorométhane-méthanol-saline) pour obtenir le système biphasique. L'ampoule est agitée puis est laissée à décanter jusqu'à la séparation de phase (~15 minutes). Les lipides sont récupérés dans la phase organique. Un rendement de 6-7 mg de lipide par 100 mg de bactéries lyophilisées a été obtenu. Pour obtenir un meilleur rendement, une modification à la méthode a été apportée. Les bactéries sont tout d'abord lysées dans

un bain de glace par sonication par tige jusqu'à dissolution du culot par impulsion de 1 min à 8 W (pour un total de 5 min) dans une saline 0,85 % (m/v). Puis, le lysat est lyophilisé avant d'être extrait selon le dernier protocole. Un rendement de 7 mg de lipide par 100 mg de bactéries lyophilisées a été obtenu.

- Adaptation de *Bligh and Dyer* [53] :

Cette technique utilise un mélange de chloroforme, de méthanol et d'eau dans un ratio volumique de 1:2:0,8 pour extraire les lipides de cellules lyophilisées. Les cellules sont laissées à reposer dans le solvant pendant 18 h. Par la suite, le mélange est décanté dans une ampoule puis du chloroforme et de l'eau sont ajoutés pour obtenir un ratio volumique de 1:1:0,9 (chloroforme-méthanol-eau). Suite à l'agitation et à la décantation, la séparation de phase est obtenue. Les lipides sont récupérés dans la phase organique. Un rendement de 5,4 mg de lipide par 100 mg de bactéries lyophilisées a été obtenu.

- Adaptation de *Folch* pour bactéries #2 [30, 31, 53]:

Les bactéries lyophilisées sont lysées par tige de sonication dans les mêmes conditions que la première méthode, mais directement dans le solvant organique (dichlorométhane et méthanol avec un ratio volumique de 2:1). Par la suite, l'extraction est poursuivie selon le protocole de *Folch*. Un rendement de 10-12 mg de lipide par 100 mg de bactéries lyophilisées a été obtenu.

#### 2.1.4.2 Protocole utilisé d'extraction des lipides à haut rendement

Le protocole finalement employé dans ce travail suite à ces essais est une adaptation de ces derniers [30, 31, 53]. Un protocole simplifié est présenté en annexe A.3. La lyse

des bactéries par sonication dans le solvant organique permet d'augmenter le rendement de la méthode *Folch* traditionnelle.

Pour un meilleur rendement, l'extraction de lipides est effectuée avec une quantité maximale de 150 mg de bactéries lyophilisées par fiole en verre de 50 mL vissable. L'extraction peut donc se faire sur 300 mg dans deux fioles de 50 mL et en combinant les surnageants dans la même ampoule (en rajoutant un volume de 20 mL de la solution de KCl supplémentaires). Une masse de lipides d'environ 12 % (m/m) de celle du culot bactérien lyophilisé est attendue.

Les cellules lyophilisées (150 mg) sont triturées à la spatule dans 30 mL de dichlorométhane-méthanol (ratio volumique 2:1) dans la fiole en verre de 50 mL. Les cellules sont par la suite soniquées sur glace avec une tige à 12 W pendant 1 min puis vortexées pendant 30 secondes. Le cycle est répété 10 fois. La fiole est centrifugée à 50 g pendant 3 minutes. Le surnageant est filtré sous vide sur un papier-filtre *Whatman* sans détacher le culot de la fiole. Le filtrat est transféré dans une ampoule à décanter. Un volume de 30 mL de dichlorométhane-méthanol (2:1) est rajouté au culot de la fiole et trois autres cycles de sonications sont effectués. La fiole est centrifugée dans les mêmes conditions et le surnageant est filtré, puis transféré dans l'ampoule. Le culot est rincé sur le papier-filtre avec 15 mL de dichlorométhane-méthanol (2:1) et le filtrat est ajouté à l'ampoule. Un système biphasique dichlorométhane-méthanol-saline (2:1:0,8) est créé dans l'ampoule en ajoutant 20 mL d'une solution aqueuse de KCl à 0,88 % (m/v). L'ampoule est bien agitée et est laissée à décanter pendant 15 min, puis la phase organique (bas) est récoltée. La phase aqueuse est rincée avec 20 mL de dichlorométhane (agitation et décantation). Le volume est réduit par roto-évaporation jusqu'à 10 mL. Le volume résiduel est évaporé sous un flux d'azote dans une fiole tarée à 40 °C. Les lipides sont alors placés au lyophilisateur pendant 1 h.

### 2.1.5 Protocole de saponification utilisé

Un protocole simplifié est présenté en annexe A.4. La saponification des phospholipides est nécessaire pour l'absorption des acides gras par la bactérie telle que présentée dans le chapitre 1 (section 1.5.3). Deux méthodes de saponification ont été étudiées. L'une de ces méthodes effectue directement la saponification sur les cellules [54], tandis que la seconde est réalisée sur les lipides extraits [55]. La méthode sur les lipides extraits a été choisie pour éviter d'inclure les acides gras hydroxylés du LPS.

#### 2.1.5.1 Protocole utilisé de saponification

La saponification est effectuée selon une adaptation de Ichihara *et al.* [55]. Un rendement de 60% est attendu en masse.

Une masse maximale de 30 mg de lipides est transférée dans une fiole vissable de 10 mL en verre. Une solution de KOH 0,5 M - méthanol 70% est préparée (3 mL KOH 1,5 M et 7 mL de méthanol) et 2 mL sont ajoutés à la fiole. La fiole est fermée avec du *Teflon* et chauffée à 70 °C pendant 1 h. Après le refroidissement de la solution, 600 µL de HCl 2 N sont ajoutés et les acides gras précipitent. Les acides gras sont extraits deux fois avec 2 mL d'*n*-hexane (transféré dans un second tube en verre vissable de 10 mL). Le tube est vortexé pendant 1 min et est centrifugé à 100 g pendant 1 min. Les deux fractions d'*n*-hexane sont lavées deux fois avec 2 mL d'eau nanopure. La fraction d'*n*-hexane est finalement évaporée sous un flux d'azote à la température de la pièce. Les acides gras ne sont ni chauffés ni placés sous vide pour éviter l'évaporation des acides gras à courtes chaînes.

### 2.1.6 Marquage des lipides d'*E. coli* au deutérium

Le marquage d'*E. coli* est effectué dans le milieu de LB (voir section 2.1.2.1). Le milieu de culture est à la température de la pièce avant d'être inoculé. Le marquage exogène est effectué à l'aide de PA-d<sub>31</sub> combiné avec de l'acide oléique pour des concentrations de 0,05, 0,10 et 0,19 mM. Le marquage endogène est réalisé avec les acides gras saponifiés extraits de la bactérie entièrement marquée dans du D<sub>2</sub>O (voir section 2.1.5.1) à une concentration de 60 mg/L (équivalente à 0,20 mM). La durée d'incubation varie selon l'expérience et le détergent utilisé est la DPC à 1 mM.

#### 2.1.6.1 Protocole utilisé de marquages exogène et endogène selon une adaptation de Tardy-Laporte *et al.* [19]

Une préculture d'*E. coli* est réalisée avec 100 µL d'inoculum (conservé à -80 °C) et 100 mL de LB. La culture est incubée dans un erlenmeyer de 500 mL pendant 16-18 h à 37 °C avec une agitation de 220 rpm. Une DO de ~3,5 est attendue.

Les acides gras exogènes ou endogènes sont dissouts dans le méthanol pour former une solution stocks précise (75-85 mg/mL d'acides gras totaux). Un volume calculé (relatif à la concentration) est ajouté à l'aide d'une micropipette dans un conique de 15 mL pour former la concentration molaire désirée pour un volume de 125 mL, soit de 0,05 mM, 0,10 mM ou 0,19 mM. L'embout de la micropipette est rincé avec du méthanol selon le même volume pipeté. Le méthanol est séché à température ambiante, car il faut éviter de chauffer les solvants organiques avec le plastique, sous un jet d'azote. Les lipides sont dissouts (possiblement micellisés) grâce à la DPC pour une concentration totale de 1 mM (125 mL). Pour ce faire, la DPC totale environ 13 fois plus concentrée, est pesée dans le même tube, puis dissoute dans 10 mL de LB. Le tube est chauffé dans un bain-marie à 95-99 °C jusqu'à dissolution des acides gras, puis

vortexé. Le tube est ensuite plongé dans de l'azote liquide et agité chaque 10 s jusqu'à ce que la solution ne soit plus liquide. Le tube peut craquer s'il est plongé trop longtemps dans l'azote liquide sans agitation. Par la suite, le tube est réchauffé dans le bain-marie jusqu'à ce que la température du bain soit à nouveau de 95-99 °C. L'opération est répétée deux autres fois. Finalement, la solution est ajoutée au milieu de culture pendant qu'elle est encore chaude (moins de 5 minutes après sa sortie du bain-marie). Pour gagner du temps avant le marquage, le tube d'acides gras peut être conservé au congélateur avant de compléter le dernier cycle dans le bain-marie.

Une fois les acides gras micellisés, la mise en contact avec les bactéries est effectuée dans un erlenmeyer de 500 mL. Pour ce faire, un volume de 110 mL de LB est ajouté, puis la solution micellaire d'acides gras encore chaude (10 mL), pour ensuite être mélangée. Un volume de la préculture est ajouté pour avoir une densité optique de 0,1 (typiquement 3-4 mL). La culture est incubée à 37 °C avec une agitation de 220 rpm. Les cultures à la phase de croissance mi-log sont récoltées après 2h00 - 2h40 pour une DO  $1,8 \pm 0,2$ . Les cultures à la phase de croissance fin-log sont récoltées après 4h45 - 5h30 pour une DO  $2,7 \pm 0,3$ . Une culture témoin est effectuée en parallèle sans la solution micellaire pour le test de viabilité cellulaire.

Une fois l'incubation terminée, la culture est centrifugée à 1500 g pendant 10 min à 4 °C dans des tubes de 50 mL. Suite à la centrifugation, le volume finale est noté et une variation de 4 mL du volume finale est tolérée. Le culot est lavé deux fois avec une saline NaCl 0,85 % (m/v) (10 mL) puis une dernière fois dans une saline 0,85 % d'eau déplétée en deutérium (5 mL). Un temps de repos de 5 min avec la saline déplétée est appliqué. Une fraction de 20 µL est conservée avant la dernière centrifugation pour une analyse de réduction MTT. Une masse fraîche de ~ 400 mg est attendue pour une culture à mi-phase exponentielle et de ~ 650 mg à la fin de la phase exponentielle.

Enfin, le culot est transféré par centrifugation dans un rotor de RMN de l'état solide de 4 mm de diamètre, préalablement taré (avec le bouchon). Un embout de pipette de 200  $\mu\text{L}$  est taillé pour que la base inférieure occupe la hauteur du bouchon dans un rotor de 100  $\mu\text{L}$ . Le haut de l'embout est coupé pour s'insérer dans un conique de 1,5 mL. L'entonnoir formé est rempli avec une micropipette avec l'embout coupé pour élargir la circonférence. Le montage du rotor dans le conique est centrifugé 2 min à 1500 g, ou 2 fois au besoin. Le bouchon est posé et la masse est alors mesurée (typiquement 105 mg) et le rotor est placé dans le spectromètre en moins de 15 min. Le reste de la culture est congelé puis lyophilisé pour permettre l'analyse des lipides et des acides gras. Un délai de 1h30 - 2h00 est estimée entre la récolte et l'insertion dans le rotor.

#### 2.1.7 Viabilité cellulaire des bactéries

Le protocole est une adaptation de Wang *et al.* [56]. Les fractions (20  $\mu\text{L}$ ) du marquage et du témoin sont diluées dans 6 mL de LB, puis vortexées. La DO est mesurée à 600 nm 4 fois par échantillons avec une dilution d'un facteur 5 (200  $\mu\text{L}$  d'échantillon et 800  $\mu\text{L}$  de LB). Le blanc est effectué avec les 800  $\mu\text{L}$  de LB sur chaque cuvette. Une valeur de 0,1 - 0,2 est attendue. Un volume de 200  $\mu\text{L}$  est incubé à 37 °C à 100 rpm pendant 2 minutes avec le tube ouvert et 20  $\mu\text{L}$  du réactif MTT à une concentration de 5 g/L dans de l'eau nanopure. Le tout est effectué en quadruplicata. Les tubes sont par la suite centrifugés à 10 000 g pendant 1 min. Le volume est retiré délicatement avec une micropipette et 800  $\mu\text{L}$  de diméthyle sulfoxide (DMSO) sont ajoutés. Les cristaux sont dissouts par sonication et vortexés. Une dilution (5 fois) est effectuée dans du DMSO (200  $\mu\text{L}$  d'échantillon dans 800  $\mu\text{L}$  de DMSO) avant d'effectuer une lecture d'absorbance à 550 nm. Les valeurs d'absorbance sont normalisées par la  $DO_{600}$  initiale. La viabilité est déterminée grâce aux témoins qui est considéré comme la viabilité absolu (100 %).

## 2.2 Protocoles de marquage isotopique pour les microalgues (*C. reinhardtii*)

Les paramètres de culture, le marquage exogène et endogène avec le test de viabilité cellulaire en cytométrie en flux sont présentés dans cette section. La méthodologie employée pour deutérer la microalgue en entier est également présentée avec l'extraction de lipides.

### 2.2.1 Matériel

La souche utilisée de *Chlamydomonas reinhardtii* 222+ de type sauvage (*wild type*) a été envoyée par Francesca Zito de l'Institut de biologie Physico-Chimique (IBPC), de Paris. L'eau lourde à 70% (D<sub>2</sub>O) provient de *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.* (Andover, MA, USA). L'ampicilline, l'eau déplétée en deutérium ainsi que le diacétate de fluorescéine proviennent de chez *Sigma-Aldrich* (Oakville, ON, Canada). Le 1-palmitoyl(d<sub>31</sub>)-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC-d<sub>31</sub>) sont de chez *Avanti Polar Lipids, Inc.*, (Alabaster, AL, USA) et les autres produits utilisés proviennent du magasin de chimie de l'UQAM. L'eau utilisée pour réaliser les solutions est nanopure ainsi que fraîche produite par osmose inversée. Les solvants organiques utilisés sont de grade HPLC ou supérieur.

La vaisselle utilisée est stérilisée par l'autoclave et le matériel à usage unique est stérile. Les solutions utilisées sont stérilisées par l'autoclave ou par filtration à 0,2 µm. Les manipulations sont effectuées dans une hotte à flux laminaire.

### 2.2.2 Milieu minimal et conditions de culture

Les protocoles simplifiés pour la réalisation du milieu de culture sont disponibles dans l'annexe A.7. Les microalgues sont repiquées sur une gélose tris-acétate-phosphate (TAP). Les conditions de cultures sont une adaptation de Arnold *et al.* [57].

La culture de *C. reinhardtii* est effectuée dans un milieu liquide. Le milieu minimal est composé de : 20 mM de Tris; 7,5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,84 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,53 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,41 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,34 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,18 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 15 mM  $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ ; 77  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 31  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 18  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 6,8  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 6,3  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,89  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  équilibré à un pH de  $7,3 \pm 0,1$ . Le milieu est supplémenté en acétate à 21 mM pour former le tris-acétate-phosphate (TAP) ou à 12 mM (0,1% m/v) de  $\text{NaHCO}_3$  pour former le minimum-tris.

Les microalgues sont cultivées sous agitation constante et illumination continue d'environ 80-100  $\mu\text{mol}$  de photon  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (*Sylvania GRO-LUX Wide Spectrum F40*) et à une température  $23\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ . Les microalgues sont comptées automatiquement sur un hématimètre de 10  $\mu\text{L}$  *Countess II FL Automated Cell Counter* de *ThermoFisher*, avec une coloration de bleu de trypan à une concentration finale de 0,2 %. Les cellules interprétées comme mortes par l'appareil ont été comptées (hématimètre normalement conçu pour analyser des globules rouges).

### 2.2.3 Acclimation au milieu deutéré

Les microalgues ont tout d'abord été inoculées dans le milieu minimal tris [57] à 30 % (v/v) de  $\text{D}_2\text{O}$  avec 0,1 % (m/v) de bicarbonate de sodium à partir d'une culture sur gélose. Afin de faciliter l'adaptation à l'eau lourde, une souche en phase stationnaire sur gélose a été utilisée et 0,1 % (m/v) de  $\text{NaCl}$  a été ajouté au milieu de culture [27]. De l'ampicilline à 0,04 % (m/v) a également été utilisée en prévention. Après 9 jours, la culture a été transférée dans un milieu à 41 % (v/v) de  $\text{D}_2\text{O}$  pendant 13 jours. Par la suite, la culture a été inoculée dans un milieu à 50 % (v/v) de  $\text{D}_2\text{O}$  sur pétri et en solution. La culture deutérée à 50 % est conservée par passage alternant du milieu culture deutéré en solution en gélose deutérée (milieu de culture deutéré et 15 g/L agar) mensuellement.

#### 2.2.4 Culture de microalgues entièrement deutérées

Les microalgues acclimatées sont cultivées dans le milieu de culture minimal tris lyophilisé puis reconstituées dans l'eau lourde à 50 % (v/v) avec 0,1 % (m/v) de NaCl. Le pH est ajusté à  $7,0 \pm 0,1$  avec les solutions de HCl et NaOH diluées dans l'eau deutérée à 70 % (v/v) de la section 2.1.3. Le  $\text{NaHCO}_3$  non marqué comme source de carbone est ajouté pour une concentration finale de 0,1 % (m/v). L'ampicilline est utilisée en prévention à 0,04 % (m/v). La culture de 200 mL estensemencée avec 20 mL de culture dans l'eau lourde à 50 % (v/v) déjà acclimatée pendant 2 semaines. La culture est incubée dans les mêmes conditions pendant encore 2 semaines. Les algues sont ensuite centrifugées pendant 3 min à 1500 g puis lyophilisées. Un rendement de 400 mg/L de cellules lyophilisées est obtenu. Une masse fraîche de 100 mg équivaut à environ 15 mg de cellule lyophilisée.

#### 2.2.5 Extraction lipidique des microalgues entièrement deutérées

Le protocole est une adaptation de plusieurs références [30, 31, 54]. L'extraction lipidique est effectuée sur 250 mg de cellules lyophilisées par fiole vissable. Deux fioles peuvent être utilisées pour un total maximal de 500 mg de cellules lyophilisées. Le protocole est très semblable à celui des bactéries (voir section 2.1.4), mais est plus rapide, car les microalgues se brisent plus facilement. Les cellules lyophilisées contiennent 10-15 % de lipides en masse.

Les cellules sont triturées dans deux fioles (250 mg/fiole) vissables en verre contenant 40 mL de dichlorométhane-méthanol dans un ratio volumique 2:1. Les cellules sont par la suite soniquées sur glace avec une tige à 12 W pendant 1 minute puis vortexées pendant 30 secondes. Le cycle est répété 5 fois. Les fioles sont centrifugées à 100 g pendant 5 min. Le surnageant est transféré dans une autre fiole. Un dépôt d'amidon est apparent dans le culot. Une réextraction avec 25 mL de solvant est effectuée sur le culot

avec 3 autres cycles de sonications, puis centrifugée. Les surnageants (130 mL) sont transféré puis filtré sous vide sur un papier-filtre *Whatman* avec un rinçage de 20 mL (2:1). Un volume final de 150 mL de solvant est placé dans une ampoule à décanter. Afin de créer un système biphasique, 40 mL de KCl à 0,88% sont ajoutés. L'ampoule est agitée vigoureusement, et la phase organique est récoltée puis évaporée dans un roto-évaporateur jusqu'à environ 10 mL, pour ensuite être évaporée sous un flux d'azote à 30 °C. Les lipides sont par la suite lyophilisés 30 minutes. Les lipides peuvent ensuite être utilisés pour le marquage endogène de *C. reinhardtii* telle quelle.

#### 2.2.6 Marquage des microalgues avec les lipides deutérés

Le protocole de marquage lipidique des microalgues est une adaptation de Garnier *et al.* [58]. Une préculture est démarrée et incubée pendant 3 à 4 jours dans le milieu de culture minimum tris avec 0,1 % (m/v) de NaHCO<sub>3</sub> non marqué (filtré stérilement à 0,20 µm) à partir d'une culture sur gélose. Au milieu de la phase exponentielle de croissance, les algues atteignent une concentration de  $\sim 2,5 \times 10^6$  cellules/mL.

Les lipides deutérés sont mis en solution dans le méthanol. Un volume adéquat est alors ajouté dans un conique en plastique de 15 mL et est évaporé sous un jet d'azote à la température de la pièce. Une concentration finale de lipide à 12,5 mg/100mL (volume final 80 mL) est utilisée pour les extraits lipidiques endogènes et 10 mg/100mL (volume final de 100 mL) pour les lipides polaires commerciaux. Un volume de 10 mL du milieu de culture sans NaHCO<sub>3</sub> est ajouté. Les lipides sont mis en solution dans le milieu aqueux grâce à une tige de sonication. La tige est réglée à 18 W et 5 cycles de 30 secondes sont appliqués sur glace suivie d'une agitation en vortex pendant 30 secondes. Le tube est alors tempéré sur la glace dans le bain sonicateur pendant 15 minutes. Les deux dernières étapes sont répétées jusqu'à dissolution. Les lipides endogènes totaux peuvent ne pas être totalement dissous.

Un compte cellulaire est effectué sur la préculture et le volume de dilution est calculé pour obtenir une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/mL pour un volume final de 80 mL (marquage endogène) ou 100 mL (marquage exogène). Par la suite, dans un erlenmeyer de 500 mL, le volume de milieu de culture de dilution est ajouté ainsi que du  $\text{NaHCO}_3$  correspondant à 0,1 % (m/v) de ce volume est ajouté. La solution de lipide est ajoutée. Le milieu est bien agité, puis l'inoculum est ajouté. Une culture témoin est lancée en parallèle sans la solution de lipides. Les cultures sont incubées dans les mêmes conditions pendant 48h.

Avant la récolte, un volume de 500  $\mu\text{L}$  est recueilli pour l'analyse de la viabilité cellulaire. Par la suite, la culture est centrifugée pendant 3 min à 1000 g dans des coniques de 50 mL. Par la suite, deux rinçages sont effectués avec une solution de lavage (86 mM NaCl et 1 mM tampon phosphate à pH 7,45) puis d'un dernier rinçage de 5 mL de la solution de lavage lyophilisée puis reconstituée avec de l'eau déplétée en deutérium. Les cellules sont par la suite analysées par RMN et la méthode de transfert dans le rotor est la même que celle pour les bactéries (voir section 2.1.6) avec avec une centrifugation à 1000 g. La fraction résiduelle des cellules est lyophilisée pour effectuer l'analyse par GC-MS.

### 2.2.7 Viabilité cellulaire des microalgues

La viabilité des microalgues est évaluée par cytométrie en flux. L'analyse est effectuée sur les microalgues marquées avec les lipides deutérés et sur la culture témoin comme comparaison. L'autofluorescence de la chlorophylle est utilisée comme marqueur ainsi que l'activité métabolique sur l'estérase qui hydrolyse le diacétate de fluorescéine (FDA).

Le test est effectué comme suit et est adapté de Jamers *et al.* [59]. Une solution stock de FDA (*Sigma-Aldrich*) est préparée à 1 mM dans le DMSO dans un vial ambré (conservée au congélateur). Une fraction de 500  $\mu\text{L}$  de la culture prélevée est diluée pour un volume final de 1 mL avec le tampon de lavage. Le tube est enveloppé dans du papier d'aluminium pour le protéger de la lumière et un volume de 5  $\mu\text{L}$  de la solution stock est ajouté. La solution est vortexée puis incubée à la température de la pièce pendant 20 min avant d'être analysée. La présence de fluorescéine (hydrolysé enzymatiquement) dans le cytosol de la cellule nous informe également que la membrane est intègre. Le FDA est donc une bonne molécule pour estimer la viabilité cellulaire.

Le cytomètre utilisé est le *BD Accuri C6* et un filtre d'atténuation à 90 % F11 est utilisé. L'appareil analyse 10 000 évènements (cellules et débris). Le logiciel pour traiter les données est le *BD Accuri C6*. Une première sélection sur les évènements sur graphique de nuage de points de la taille (FSC : Lumière diffusée vers l'avant) en fonction de la granulosité (SSC : Lumière diffusée latéralement) est effectuée pour éliminer les débris. Les résultats de l'autofluorescence de la chlorophylle et de la fluorescéine ont été interprétés en s'adaptant de Jamers *et al.* [59].

- Autofluorescence de la chlorophylle

Deux populations peuvent être observées et sélectionnées sur le graphique de nuage de points. La première population (P1) est diffuse avec une intensité de fluorescence et de granulosité faible. La seconde population de cellule (P2) est plus ciblée et l'intensité de fluorescence et de granulosité est plus grande. Un histogramme est ensuite généré pour ces deux populations pour l'intensité d'autofluorescence de la chlorophylle en fonction du comptage de cellules. Le pourcentage des populations P1 et P2 peut donc être relié à l'intensité de l'autofluorescence de la chlorophylle moyenne. Ces valeurs sont ensuite comparées au témoin.

- Fluorescéine (FDA hydrolysé)

Deux régions peuvent être isolées sur le graphique en nuage de points de la taille (FSC) en fonction de l'autofluorescence de la chlorophylle. Une première région est plus diffuse avec une taille plus faible et une faible intensité de chlorophylle. Une seconde région est plus concentrée avec des microalgues de fortes tailles et une fluorescence de la chlorophylle plus intense. Un histogramme est alors généré à partir de ces deux régions de l'intensité de la fluorescéine en fonction du compte cellulaire. Le pourcentage de ces régions peut donc être relié à l'intensité moyenne de la fluorescéine hydrolysée. Ces valeurs sont ensuite comparées au témoin.

### 2.3 Analyse des chaînes d'acides gras par GC-MS

Cette section présente les étapes pour l'analyse des acides gras par GC-MS. Elle inclut donc une méthode d'extraction lipidique plus rapide, adaptée aux petites masses, et leur méthylation (une étape de dérivation nécessaire pour volatiliser les acides gras). La méthode d'analyse sur l'appareil (GC-MS 7890A, *Agilent Technologies*) est finalement présentée ainsi que l'interprétation spectrale. Un protocole simplifié est présenté en annexe A.5 pour l'extraction des lipides et en A.6 pour la méthylation.

#### 2.3.1 Extraction lipidique sur petite masse (5-10 mg)

L'extraction lipidique est une adaptation de deux protocoles [30, 31]. Toute la vaisselle est lavée trois fois avec le solvant d'extraction et un blanc est réalisé avec chaque série d'extraction. Suite à la lyophilisation du contenu du rotor ou de l'échantillon, les cellules sont placées dans une éprouvette de 10 mL vissable. Un volume de 4 mL de

solvant d'extraction, soit le dichlorométhane-méthanol pour un ratio volumique de 2:1, est ajouté. L'échantillon est soniqué sur glace avec une tige à 6 W pendant 30 s puis vortexé pendant 30 s. L'opération est répétée une fois. Le tube est alors centrifugé à 150 g pendant 2 min. Le surnageant est transféré dans une éprouvette graduée en le filtrant sur laine de verre dans une pipette de verre (préalablement rincée). L'extraction est répétée une autre fois et le surnageant est ajouté dans le même tube. Une solution de KCl à 0,88 % (m/v) est ajoutée afin de respecter un ratio de volume de solvant d'extraction et de solution aqueuse de 3:0,8. Le tube est fermé avec un bouchon puis vortexé (la pression s'échappe) et centrifugé une dernière fois. La phase inférieure est recueillie, puis évaporée sous un jet d'azote à 40 °C dans une fiole de 4 mL tarée. L'échantillon est ensuite placé au lyophilisateur sous vide pendant 1h.

### 2.3.2 Méthylation

Un protocole simplifié est présenté en annexe A.6. La méthylation des lipides est effectuée selon l'adaptation de Tardy-Laporte *et al.* [19]. Les lipides extraits sont transférés avec le mélange de solvant dichlorométhane-méthanol dans un ratio volumique de 2:1 dans une fiole de 10 mL vissable puis évaporés à 40 °C sous jet d'azote. Un volume de 2 mL de méthanol à 2 % (v/v) d'acide sulfurique fraîchement préparé est ajouté ainsi que 800 µL de toluène. Le tube est fermé et son étanchéité\* est assurée par un film de *Teflon* entre le filetage et le bouchon. Le tube est maintenu à 95-100 °C pendant 10 min dans un bain-marie. Une fois refroidi, le tube est ouvert et 4 mL d'eau nanopure sont ajoutés ainsi que 800 µL de n-hexane. Le tube est alors vortexé 30 s puis centrifugé à 150 g pendant 2 min afin de bien séparer les phases. Le maximum d'hexane est récupéré sans toucher à la phase aqueuse et un rinçage avec un plus petit volume d'hexane peut être effectué au besoin (concentration faible d'échantillon). Le solvant organique est transféré dans un vial de 4 mL taré pour évaporation sous azote

à la température ambiante. Des traces d'hexane peuvent être résiduelles, mais la lyophilisation ou un chauffage sont à proscrire car ils pourraient aussi faire évaporer des acides gras à courtes chaînes. Les acides gras sont solubilisés dans le n-hexane dans le même vial pour atteindre une concentration approximative de 1 mg/mL. La solution est filtrée puis insérée dans un insert dans un vial ambré. Les vials sont conservés au congélateur.

\*Il est à noter que si l'étanchéité n'est pas assurée, le méthanol s'évapore augmentant ainsi la concentration d'acide sulfurique qui peut alors attaquer les insaturations ainsi que les cyclopropylations.

### 2.3.3 Standard

Le standard *Fatty Acid Methyl Ester (F.A.M.E) MIX, C4-C24 100mg Neat (Sigma-Aldrich)* Lot LRAB8516 est utilisé et dilué à 1 mg/mL dans de l'hexane. Ce standard ainsi que le certificat d'analyse sont utilisés pour corriger les aires des pics suite à la spectrométrie de masse sur les acides gras qui ne s'ioniseraient pas tous de façon équivalente. Les acides gras cyclopropylés sont corrigés selon l'aire des acides gras saturés de nombre de carbones équivalents. Les acides gras deutérés sont corrigés à l'aide de l'aire des acides gras protonés. Les acides gras insaturés (C18:1,2,3) sont parfois corrigés à l'aide d'aire non résolu (faiblesse technique de la colonne utilisée) ou avec la correspondance la plus proche (par exemple C16:1 pour C18:1). Il est à noter que la détermination du profil d'acides gras via le ratio en pourcentage molaire des acides gras est une analyse qualitative qui ne requiert pas d'étalon interne.

#### 2.3.4 Méthode d'analyse

Les méthodes GC-MS ont été optimisées à partir d'une méthode préexistante sur l'appareil (GC-MS 7890A, *Agilent Technologie*) sur les extraits de bactéries et de microalgues marquées. La méthode FAMECOLI1018E est utilisée pour les bactéries ainsi que les microalgues.

- FAMECOLI1018E

Une colonne de HP-5ms (5 % Phényl Méthyl Siloxane) de 30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$  est utilisée sous hélium. L'injecteur est chauffé à 250 °C et 1  $\mu\text{L}$  est injecté avec un *split* de 10:1 et une pression de 13,332 psi.

Les rampes de températures testées sont présentées dans le tableau 2.1. La rampe finalement choisie (E) est la suivante : la température du four est maintenue à 150°C pendant 5 min, puis augmentée à 177 °C à un taux de 3 °C/min, pour ensuite atteindre 201 °C à un taux de 1,5 °C/min, puis 210 °C à un taux de 3 °C/min et finalement à 255 °C à un taux de 6 °C/min.

La colonne est nettoyée à 300°C pendant 5 min par la suite. Un délai de solvant de 3 min est appliqué au détecteur de masse en mode *gain factor*. L'ionisation électronique est générée avec un filament à 1459 volts. Les masses de 40 à 600 Uma sont analysées.

La méthode E permet de séparer avec la meilleure résolution possible les acides gras retrouvés chez *E. coli* ainsi que chez *C. reinhardtii* le plus rapidement possible. Les acides gras froids et deutérés saturés ainsi que les cyclopropylés peuvent être séparés. Les acides gras insaturés à 18 carbones ne peuvent être séparés les uns des autres sur cette colonne, et ce même en mode isotherme (170 °C pendant 40 min).

Les analyses sont effectuées sur une colonne HP-5ms qui est composée à 5 % de phényle sur du méthylpolysiloxane. Cette colonne pourrait être remplacée par une colonne plus adaptée pour séparer les acides gras comme la DB-23, tel qu'employé par Burja *et al.* [60]. Cette dernière est composée à 50 % de cyanopropyle sur également du méthylpolysiloxane. Les ramifications de cyanopropyle ont une plus grande interaction que le phényle pour séparer les acides gras.

Tableau 2.1 Différentes rampes de température pour séparer les acides gras par GC-MS

A			B		
Temps (min)	Température °C	Rampe °C/min	Temps (min)	Température °C	Rampe °C/min
5,0	150		5,0	150	
25,0	160	0,5	15,0	160	1
40,0	175	1	22,5	175	2
60,0	185	0,5	32,5	180	0,5
81,7	250	3	50,0	250	4

C			D		
Temps (min)	Température °C	Rampe °C/min	Temps (min)	Température °C	Rampe °C/min
5,0	150		5,0	150	
14,0	177	3	25,0	160	0,5
29,3	200	1,5	40,0	175	1
40,4	250	4,5	60,0	185	0,5
			81,7	250	3

E		
Temps (min)	Température °C	Rampe °C/min
5,0	150	
14,0	177	3
30,0	201	1,5
33,0	210	3
40,5	255	6

### 2.3.5 Traitement spectral

Les pics sont identifiés grâce au temps de rétention du standard ainsi que par la spectrométrie de masse. La base de données spectrale *National Institute of Standards and Technology* (NIST) est employée avec parcimonie. L'aire corrigée des pics est utilisée et une seconde correction est apportée pour chaque acide gras grâce au standard FAME. Les pics deutérés ont un temps de rétention inférieur au pic froid possiblement causé par les ponts hydrogène plus faibles. Les pourcentages relatifs molaires des acides gras sont par la suite calculés.

## 2.4 Analyse de RMN

Cette section présente la méthode de préparation d'échantillon ainsi que les paramètres expérimentaux nécessaires pour effectuer les analyses RMN en solution et de l'état de solide. Le traitement des données y est également présenté.

### 2.4.1 RMN en solution (Bactéries)

La nature des têtes polaires des lipides deutérés extraits est caractérisée par RMN en solution sous trois noyaux, soit proton ( $^1\text{H}$ ), deutérium ( $^2\text{H}$ ) et phosphore ( $^{31}\text{P}$ ). Deux compositions sont utilisées pour analyser les têtes polaires en RMN en solution. Elles utilisent un agent chélateur pour libérer le phosphore des métaux divalents qui élargissent le signal. Une masse de lipides de 5-10 mg est dissoute dans les deux mélanges testés. Le premier mélange (500  $\mu\text{L}$  chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ), 200  $\mu\text{L}$  méthanol ( $\text{MeOH}$ ) et 50  $\mu\text{L}$  d'acide éthylènediaminetétraacétique partiellement neutralisé à l'hydroxyde de potassium ( $\text{EDTA-KOH}$ ) 200 mM pH 6) est biphasique et nécessite une période de décantation des deux phases [61]. Le second mélange utilisé (500  $\mu\text{L}$   $\text{CDCl}_3$ , 400  $\mu\text{L}$   $\text{MeOH}$  et 100  $\mu\text{L}$  d'acide trans-1,2-cyclohexyldiaminetétraacétique partiellement neutralisé à l'hydroxyde de césium ( $\text{CDTA-CsOH}$ ) 200 mM pH 6) est monophasique [62]. Le mélange monophasique est censé être plus performant avec l'utilisation de CDTA et du césium comme contre ion qui aurait la plus faible affinité pour se lier à la charge du phosphore. Aucune différence spectrale n'a été notée pour les deux mélanges analysés. Le protocole biphasique a donc été utilisé avec l'EDTA et le KOH car il est plus abordable.

Les spectres de RMN en solution sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre *600 MHz Bruker Avance III-HD* à large bande (Billerica, MA, USA) avec une sonde BBFO 5 mm à double résonance. Les lipides sont solubilisés dans le mélange monophasique puis laissé décanter. Ils sont analysés à 298 K. Pour le phosphore et le proton, le signal est verrouillé sur le signal du chloroforme deutéré.

- RMN en solution -  $^{31}\text{P}$  [61]

Le phosphore résonne à 243 MHz sur ce spectromètre. Le temps d'acquisition est de 0,2818 s avec une largeur de balayage de 120 ppm. Une impulsion de  $90^\circ$  est effectuée avec une durée de 15  $\mu\text{s}$  à une puissance de 16,5 W. Un découplage en proton est effectué pendant l'acquisition avec une séquence WALTZ16 d'une durée de 70  $\mu\text{s}$  à une puissance de 1,31 W. Un délai de relaxation de 7 s est appliqué avant chaque acquisition pour pouvoir quantifier nos résultats. Le spectre est obtenu avec 128 acquisitions en 16 min.

- RMN en solution -  $^1\text{H}$

Le proton résonne à 599,9 MHz sur ce spectromètre. Le temps d'acquisition est de 2,73 s avec une largeur de balayage de 20 ppm. Une impulsion de  $30^\circ$  est effectuée avec une durée de 15  $\mu\text{s}$  et une puissance de 28,5 W. Aucun découplage n'est appliqué. Un délai de relaxation de 1 s est appliqué avant chaque acquisition. Le spectre est enregistré en 32 acquisitions en 2 min.

- RMN en solution -  $^2\text{H}$

Le deutérium résonne à 92 MHz sur ce spectromètre. Le temps d'acquisition est de 1,5 s avec une largeur de balayage de 30 ppm. Une impulsion non optimisée provenant du canal de verrouillage d'une durée de 75  $\mu\text{s}$  à une puissance de 3 W est appliqué sans découplage. Un délai de relaxation de 3 s est appliqué avant chaque acquisition. Le spectre est enregistré en 256 acquisitions en 20 min.

#### 2.4.2 RMN de l'état solide (RMN-ÉS)

Les spectres RMN-ÉS sont enregistrés avec un spectromètre *400 MHz Bruker Avance III-HD* à larges bandes (Milton, ON, Canada). La fréquence de résonance du deutérium sur ce spectromètre est de 61,4 MHz et une sonde solide à deux canaux avec la rotation à l'angle magique pour des rotors de 4 mm de diamètre est utilisée. La vitesse de rotation employée est de 10 kHz et une correction de la température est apportée. Une période d'équilibration de la température de 15 min est effectuée avant l'accord de la sonde.

Une séquence d'écho de Hahn [15] est utilisée avec une impulsion initiale de 90° d'une durée de 4,5µs avec une puissance approximative de 180 W, avec un délai interpulse d'une période de rotation du rotor, donc de 100 µs, suivi d'une seconde impulsion de 180° d'une durée de 9 µs avec également d'une puissance de 180 W. Le délai avant l'enregistrement du signal est de 80 µs, puis le nombre de points à éliminer sont ajustés (DW= 0,5 µs). Le délai de relaxation est de 500 ms.

Le culot bactérien (*E. coli*) est placé dans un rotor de 100 µL. La température est réglée à 310 K (37 °C). Un spectre de 3072 acquisitions est enregistré en 53 minutes entre deux spectres 1024 acquisitions.

Le culot de microalgue du marquage endogène (*C. reinhardtii*) est placé dans un rotor de 50 µL. La température est réglée à 298K (25°C). Deux spectres de 61444 acquisitions sont enregistrés en 1h45. Les deux spectres sont additionnés via la fonction *addfid* ( et *edc2*) qui sera traitée.

L'utilisation d'un séparateur de signal pour un oscilloscope oblige à augmenter la puissance à 250 W et limite l'utilisation d'une impulsion de 90° afin de garantir l'uniformité du signal. Alors parfois, une impulsion initiale de 45° avec une durée de 2  $\mu\text{s}$ , avec un délai interpulse d'une rotation de 98  $\mu\text{s}$  (période de rotor de 100  $\mu\text{s}$ ), suivie d'une seconde impulsion de 180° d'une durée de 8  $\mu\text{s}$  a été utilisé. Cette séquence est un peu moins sensible que la précédente. Le délai avant l'enregistrement du signal est de 90  $\mu\text{s}$ . Le spectre est enregistré avec un délai de digitalisation (*dwell time*) de 1  $\mu\text{s}$  sur une largeur spectrale de 500 kHz pour un temps d'acquisition de 131 ms.

Certains spectres RMN-ÉS ont été enregistrés avec un spectromètre *600 MHz Bruker Avance III-HD* (Milton, Ontario, Canada). La fréquence de résonance du deutérium est à 92,1 MHz. Une sonde solide est utilisée à deux canaux à large bande avec la rotation à l'angle magique pour des rotors de 4 mm de diamètre. La vitesse de rotation employée est de 10 kHz. Une séquence d'écho de Hahn a été utilisée, soit une impulsion initiale de 90° avec une durée de 5  $\mu\text{s}$  et une puissance de 265 W suivis d'un délai interpulse d'une période de rotation de 95,5  $\mu\text{s}$  et d'une seconde impulsion de 180° d'une durée de 10  $\mu\text{s}$  avec la même puissance. Le délai avant l'enregistrement du signal est de 80  $\mu\text{s}$ , puis le nombre de points à éliminer sont ajustés.

#### 2.4.3 Traitement (RMN-ÉS)

Les données sont ensuite converties en analogue avec la fonction *convdta*. Une apodisation exponentielle (*line broadening*) de 100 Hz est apportée. Le spectre est traité avec le logiciel *MestRenova V6.0* (*Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Espagne*). Une correction automatique de la ligne de base est apportée (*Whittaker Smoother*). Les pics sont ensuite intégrés manuellement et les moments sont calculés à partir d'un script écrit par Pierre Audet de l'Université Laval (*MomentsSpectraux.qc aout 2018*).

## 2.5 Notions théoriques de la RMN du deutérium

Comme présenté dans les ouvrages de référence [63-66], l'effet *Zeeman* provoque la levée de la dégénérescence des niveaux d'énergie des spins dans le champ magnétique, ce qui nous permet de pouvoir réaliser des mesures de la résonance magnétique nucléaire. Un noyau quadripolaire comme le deutérium va perturber ces interactions d'une manière plus intense que le couplage dipolaire ou le déplacement chimique qui peut être observé sur les noyaux de spin de  $\frac{1}{2}$ .

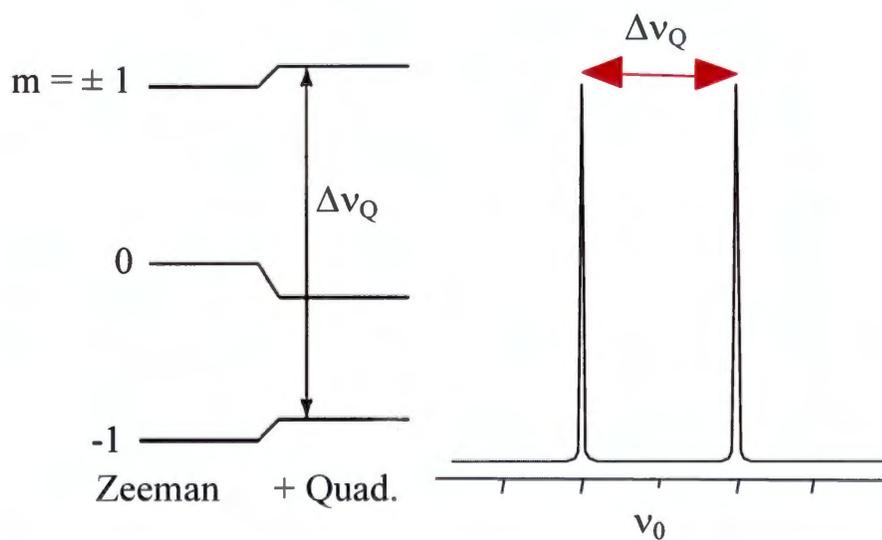


Figure 2.1 Perturbation de l'effet *Zeeman* par l'effet quadripolaire et représentation de l'écart quadripolaire, adaptation de [65, 66]

### 2.5.1 Écart quadripolaire rigide

- Deutéron isolé

Un deutéron isolé et immobile (à 0 K en théorie), placé dans un champ magnétique, selon son environnement chimique et son orientation dans le champ magnétique, présentera un simple doublet, dont l'écart sera défini par l'équation 2.1 de l'écart quadripolaire rigide [15, 63] :

$$\Delta\nu_{Qr} = \frac{3}{2} \times C_Q \times \frac{3\cos^2\theta_{CD}-1}{2} \quad (\text{Équation 2.1})$$

$\Delta\nu_{Qr}$	=	Écart quadripolaire rigide (kHz)
$c_Q$	=	Constante de couplage quadripolaire (kHz)
$\theta_{CD}$	=	Angle de la liaison carbone-deutérium dans le champ magnétique ( $B_0$ )

La constante de couplage est propre à chaque noyau et environnement électronique et est mesurée empiriquement. La référence de Barnes *et al.* [67] présente les constantes de couplage mesurées à de basses températures pour plusieurs molécules. Les charges de l'atome de deutérium participent de l'ordre de 10 % au gradient électrique qui va dépendre de l'environnement moléculaire. Par exemple, la constante de couplage à 77 K du deutérium sur un benzène est de 181 kHz, alors que sur un cyclohexane, elle est de 174 kHz. Cette différence peut être expliquée par les longueurs de liaisons ( $sp^3$  et  $sp^2$ ) ainsi que par la liaison  $\pi$  du cycle aromatique qui modifie la densité électronique du cyclohexane tel que représenté à la figure 2.2.

Il est intéressant de noter que dans un complexe ou un cristal symétrique, le gradient est nul, ce qui vient annuler l'interaction quadripolaire. Le deutérium dans une chaîne acyle d'un lipide a une constante de couplage d'environ 170 kHz [67].

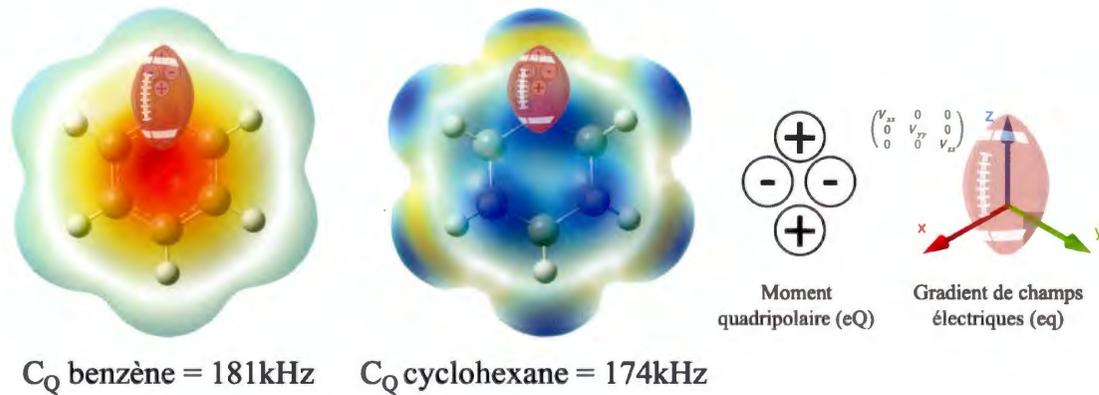


Figure 2.2 Représentation des éléments de la constante de couplage quadripolaire pour le benzène et cyclohexane, le potentiel électrostatique est utilisé pour représenter le gradient de champs électriques

- Spectre de poudre

On remarquera dans l'équation 2.1 la dépendance angulaire de l'écart quadripolaire rigide. Si notre échantillon est composé d'une grande quantité de molécules portant toutes le même deutéron, mais cette fois-ci orientée dans toutes les directions possibles et réparties de façon équiprobables, alors on doit intégrer cette équation sur tout l'espace et on obtient ce qu'on appelle un « spectre de poudre ».

L'angle  $\theta_{CD}$  est celui du tenseur ( $V_{ZZ}$ ) du gradient de champ électrique dans le champ magnétique ( $B_0$ ). Le tenseur ( $V_{ZZ}$ ) est dans l'axe de la liaison covalente. Pour plus de détails sur le gradient de champ électrique, voir la référence de Wasylishen *et al.* [65]. L'interaction est à son maximum pour une orientation de  $0^\circ$  ou  $180^\circ$  tel que représenté à la figure 2.3. L'interaction est éclipée à un angle de  $54,7^\circ$  que l'on appelle l'angle magique.

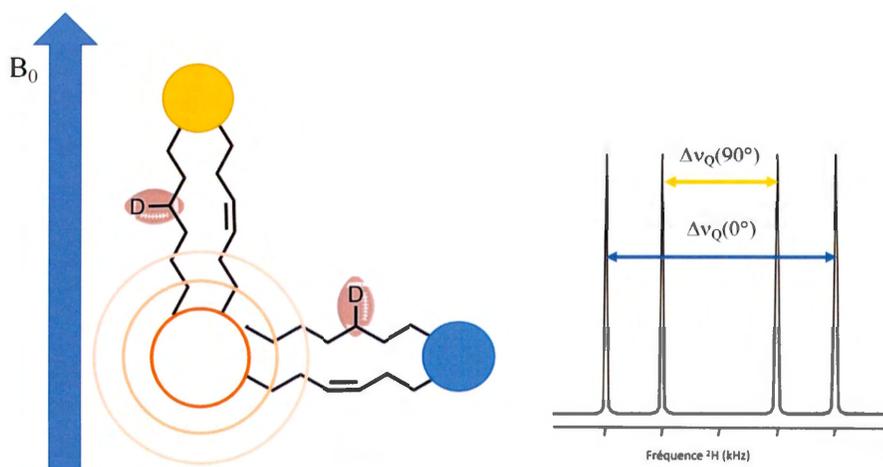


Figure 2.3 Représentation de la composante angulaire de l'éclatement quadripolaire rigide pour un phospholipide avec un seul atome deutéré dans deux orientations

Comme présenté à la figure 2.4, pour une membrane multilamellaire qui contiendrait des lipides deutérés à un seul endroit, toutes les orientations sont équiprobables dans le champ magnétique, mais il y en a plus dans le plan équatorial ( $90^\circ$ ) qu'aux pôles ( $0^\circ$ ).

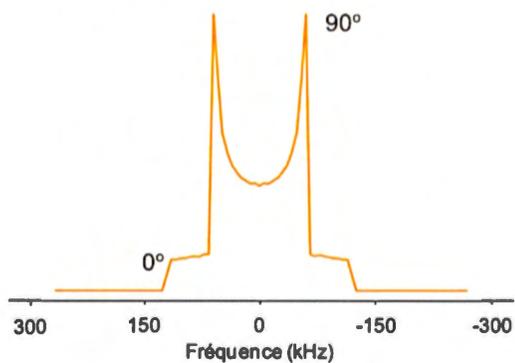


Figure 2.4 Spectre de poudre théorique pour une membrane multilamellaire avec des phospholipides ayant un seul deutéron [66]

### 2.5.2 Écart quadripolaire

Dans un cas plus réaliste, la molécule n'est pas rigide, mais animée de mouvements, et l'écart quadripolaire mesuré est la moyenne de l'écart quadripolaire rigide. Le paramètre d'ordre est présenté dans l'équation suivante, où les crochets indiquent une moyenne spatiale. Ainsi, le paramètre d'ordre dépend de l'amplitude des mouvements [64], tel que présentée par l'équation 2.2 du paramètre d'ordre de la liaison carbone-deutérium ( $S_{CD}$ ):

$$S_{CD} = \left\langle \frac{3\cos^2\theta_{CD} - 1}{2} \right\rangle \quad (\text{Équation 2.2})$$

$S_{CD}$  = Paramètre d'ordre de la liaison carbone-deutérium  
 $\theta_{CD}$  = Angle de la liaison carbone-deutérium dans le champ magnétique ( $B_0$ )

L'écart quadripolaire d'un groupement carbone-deutérium est donc défini par cette équation 2.3 [63, 65] :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \times C_Q \times S_{CD} \quad (\text{Équation 2.3})$$

$\Delta\nu_Q$  = Écart quadripolaire (kHz)  
 $C_Q$  = Constante de couplage quadripolaire (kHz)  
 $S_{CD}$  = Paramètre d'ordre de la liaison carbone-deutérium

L'écart quadripolaire ( $\Delta\nu_Q$ ) dépend d'une constante de couplage propre au système étudié (noyau et environnement électronique) et d'un paramètre d'ordre. On remarque que ce paramètre est compris entre 0 et 1, et qu'il représente donc l'atténuation (dû à la dynamique) de l'écart quadripolaire rigide [15].

Alors que la mesure de l'écart quadripolaire rigide est propre à la molécule étudiée, c'est la mesure du paramètre d'ordre qui nous indique l'état dynamique dans lequel cette molécule se trouve. Ainsi dans un même lipide, comme on le voit à la figure 2.5, le paramètre d'ordre d'un groupement CD en bout de chaîne est beaucoup plus faible (amplitude de mouvements plus grande) que celle d'un CD proche du squelette glycérol (amplitude de mouvements plus faible). Le paramètre d'ordre a également été beaucoup utilisé pour déterminer des températures de transition entre la phase gel et la phase fluide d'une bicouche lipidique. Dans ce mémoire, c'est la mesure globale des paramètres d'ordres dans les lipides qui va nous indiquer si les lipides se trouvent dans une membrane rigide ou fluide.

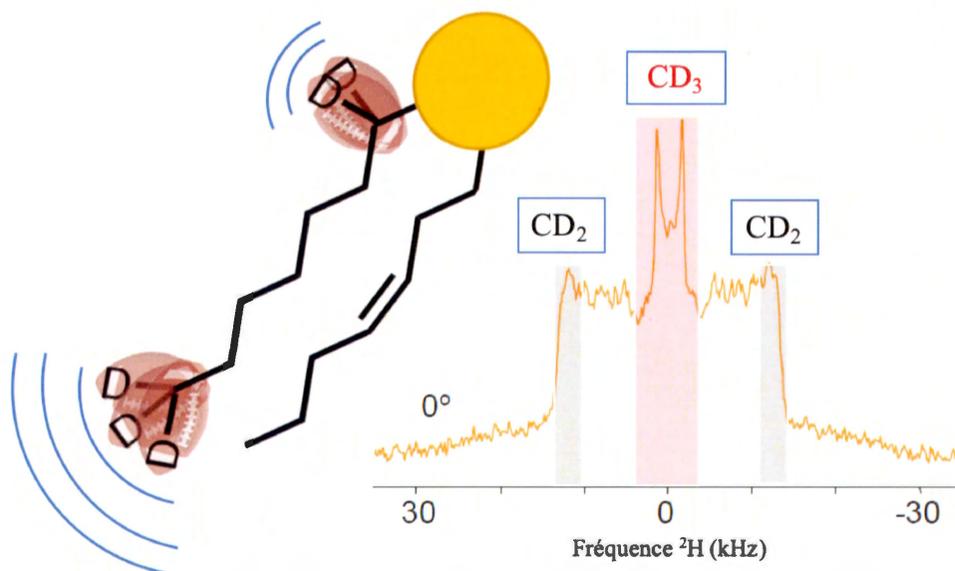


Figure 2.5 Variation du paramètre d'ordre sur une chaîne acyle d'une membrane modèle, Adaptation de Marcotte [66]

Afin d'augmenter le signal, une partie de l'interaction peut aussi être moyennée par rotation à l'angle magique [15, 68], présenté dans la prochaine section.

### 2.5.3 Rotation à l'angle magique (MAS)

Comme présenté dans les références [15, 66, 68], la rotation rapide à l'angle magique permettrait de projeter les vecteurs des interactions à un angle de  $54,7^\circ$ , l'angle « magique » qui annulerait l'écart quadripolaire. Pour ce faire, il faudrait donc tourner à plus de 200 kHz, ce qui n'est pas encore techniquement possible à ce jour. Tel que présenté sur la figure 2.6, une rotation de 10 kHz, dans notre cas, transforme le spectre en une bande centrale (où une résolution suffisante permettrait d'observer le déplacement chimique isotrope des différents deutérons), flanquée de bandes de rotation écartées de 10 kHz les unes des autres.

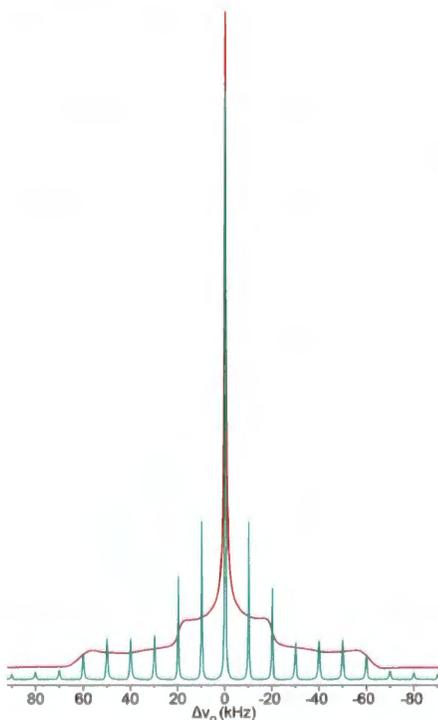


Figure 2.6 Spectre de RMN du  $^2\text{H}$  de lipides deutérés, en mode statique (rouge) et avec MAS (vert) à une vitesse de rotation de 10 kHz

#### 2.5.4 Second moment

Comme expliqué plus haut, la détermination du paramètre d'ordre d'un groupement CD s'effectue en mesurant l'écart quadripolaire observé, en le comparant à l'écart quadripolaire rigide. Dans le cas où plusieurs groupements CH sont deutérés (CD), plusieurs écarts quadripolaires peuvent parfois être mesurés, et plusieurs paramètres d'ordre peuvent être déterminés. Dans le cas de membranes biologiques uniformément marquées au deutérium, il est parfois difficile de distinguer clairement les écarts quadripolaires à chaque position le long des chaînes de chaque lipide et d'en déduire les paramètres d'ordre.

Une autre approche a donc été développée, utilisant une propriété mathématique, celle des moments spectraux présentés dans ces références [15, 68]. En effet, on remarque que le second moment ( $M_2$ ) d'un spectre deutérium est proportionnel à la moyenne (crochets) des paramètres d'ordre de tous les CD contenus dans ce spectre. L'équation 2.4 présente la corrélation du second moment avec le paramètre d'ordre [15, 64] :

$$M_2 = \frac{4\pi^2}{5} \times \nu_Q^2 \times \langle S_{CD}^2 \rangle \quad (\text{Équation 2.4})$$

$M_2$	=	Second moment ( $s^{-2}$ )
$\nu_Q$	=	Fréquence quadripolaire (kHz)
$S_{CD}$	=	Paramètre d'ordre (lien carbone-deutérium)

La fréquence quadripolaire ( $\nu_Q$ ) est la constante de couplage (170 kHz pour les chaînes acyles) multiplié par le facteur d'un spin de 1, soit 3/2 [65].

Dans le cadre de cette expérience, le second moment sera calculé par l'équation 2.5 qui est adaptée pour la rotation à l'angle magique [15, 68] :

$$M_2 = \omega_r^2 \frac{\sum_{N=0}^{\infty} N^2 A_N}{\sum_{N=0}^{\infty} A_N} \quad (\text{Équation 2.5})$$

$M_2$	=	Second moment (s <sup>-2</sup> )
$\omega_r$	=	Vitesse de rotation (Hz) x 2π
N	=	Nième bande de rotation
A	=	Intégration d'une bande de rotation

Dans cette équation, la bande centrale est considérée comme une bande de rotation où N=0. Il est à noter que l'intégration commence à 0 Hz (centre de la bande centrale), jusqu'à toutes les bandes de rotation positives (droite du spectre). L'intégration de la bande centrale doit donc être prise de moitié au dénominateur. Comme le spectre de <sup>2</sup>H est censé être symétrique, l'intégration des bandes négatives peut être prise en compte pour obtenir un  $M_2$  moyen. De cette manière, l'erreur causée par le ratio plus faible de signal/bruit des dernières bandes de rotation peut être moyennée.

De manière générale, une membrane rigide, qui est par exemple, à basse température aura un second moment plus grand qu'une membrane fluide. Cette différence est expliquée par le mouvement plus restreint des chaînes acyles en phase gel qui augmentent le paramètre d'ordre. Une composition en lipides saturés plus grande peut rigidifier et faire augmenter le  $M_2$  de manière semblable à la température.

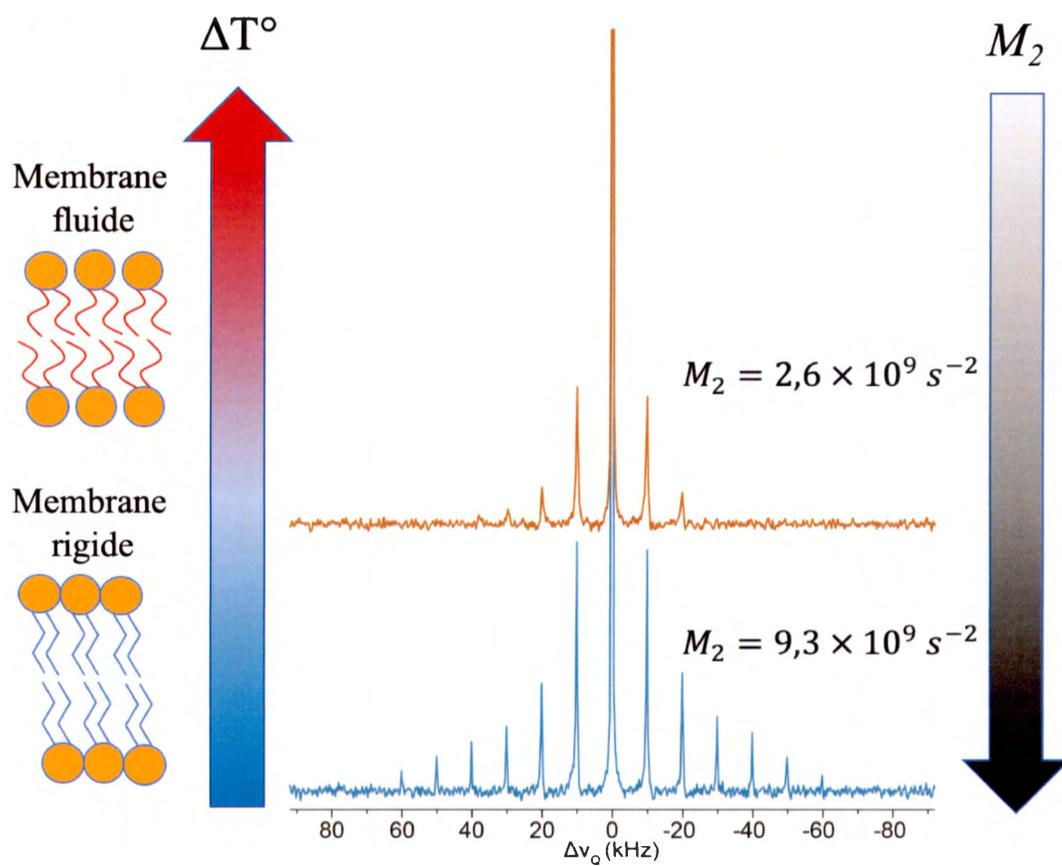


Figure 2.7 Spectre de RMN du  $^2\text{H}$  d'une membrane rigide (bleu) et d'une membrane fluide (rouge) pour *E. coli* en rotation à l'angle magique à 10 kHz. Marquage lipidique d'acide palmitique deutéré et oléique à 0,19 mM de bactéries récoltées à la phase mi-exponentielle. La culture fraîche est présentée en bleu et la culture incubée dans une saline pendant 2h30 en rouge.



## CHAPITRE III

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, les résultats sont discutés à la suite de leur présentation, suivis d'une synthèse à la fin de chaque section. Une première section (3.1) porte sur les conditions optimales pour le marquage exogène des lipides de la membrane d'*E. coli* au deutérium. Les paramètres d'optimisation sont la récolte de la culture selon sa phase de croissance ainsi que la concentration d'acides gras deutérés utilisés. Par la suite, la section suivante (3.2) présente la deutération de la bactérie entière au moyen de D<sub>2</sub>O, ainsi que la caractérisation de ses lipides qui font office d'acides gras endogènes. Les résultats du marquage au moyen de ces derniers sont exposés ainsi que comparés à ceux du marquage exogène. Afin de déterminer l'effet du marquage au <sup>2</sup>H des lipides membranaires, la viabilité cellulaire à la suite du marquage est analysée. Une dernière section (3.3) élabore sur la comparaison entre les marquages exogène et endogène de *C. reinhardtii*. La microalgue entièrement deutérée ainsi que son profil lipidique sont présentés. La viabilité cellulaire est déterminée par cytométrie en flux. Pour les deux microorganismes étudiés, les taux de marquage ainsi que les profils d'acides gras sont déterminés par GC-MS. La fluidité membranaire est analysée au moyen du second moment sur les spectres de RMN-<sup>2</sup>H des cellules fraîches.

### *Limite de l'analyse GC-MS du profil d'acides gras pour E. coli et C. reinhardtii.*

Dans les analyses du profil d'acides gras par GC-MS, le pourcentage relatif d'acides gras est un pourcentage molaire des acides gras froids et/ou deutérés. La correction apportée aux acides gras deutérés est la même que celle des acides gras froids équivalents. Le facteur de correction est calculé grâce aux résultats de GC-MS corrigés avec un standard. La masse molaire des acides gras froids est donc appliquée pour calculer le pourcentage relatif des acides gras deutérés, car l'intensité du signal dépend de l'ionisation de la molécule et les signaux sont corrigés avec le standard froid. Il est à noter que les acides gras cyclopropylés sont corrigés à l'aide d'un acide gras saturé de mêmes nombres de carbones. Les cyclopropyles sont considérés comme une insaturation. Les C18 :1 des bactéries sont corrigés avec un facteur de correction de C16 :1, car les C18 :1,2,3 du standard ne sont pas résolus. Pour le marquage exogène, les C18 :1 sont la somme de l'acide cis-vaccénique produit par la bactérie et de l'acide oléique exogène incorporé. Pour les microalgues, C18 :1,2,3 sont regroupés et le facteur de correction est la moyenne des C18 :1,2,3 du standard, les C18 :1,2,3 deutérés ne peuvent être résolus des C18 :1,2,3 froids. Le nombre présenté entre parenthèses est l'écart-type de la valeur.

### 3.1 Optimisation du marquage exogène d'*E. coli* au $^2\text{H}$

Comme exposé dans la section 1.3.2 sur les précédents du marquage, les études de la membrane d'*E. coli* au  $^2\text{H}$  ont été effectuées avec une concentration d'acides gras exogènes sans optimisation. Les concentrations d'acide palmitique deutéré utilisées dans la littérature sont de 0,17 mM [17, 18] et de 0,19 mM [15] combiné avec de l'acide oléique froid ou bien de 0,25 mM seul [19]. L'impact de la phase de croissance sur la membrane n'a pas été étudié. Cette section présente le cheminement pour l'optimisation de marquage d'*E. coli* avec l'utilisation de lipides exogènes commerciaux, soit l'acide palmitique perdeutééré (PA-d<sub>31</sub>) ainsi que l'acide oléique (OA) non marqué (froid) pour des concentrations de 0,05 mM, 0,10 mM et de 0,19 mM. L'incidence de la phase de croissance sur la fluidité de la membrane est également exposée pour la première fois sur trois niveaux de la phase logarithmique.

### 3.1.1 Effet de la phase de croissance

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la phase de croissance de la bactérie sur le marquage au  $^2\text{H}$  ainsi que sur la fluidité membranaire. La bactérie *E. coli* est cultivée dans le milieu de culture LB avec un volume représentant 25 % de celui de l'erlenmeyer utilisé, à 37 °C avec une agitation constante (220 rpm). La culture est inoculée avec une préculture pour une densité optique initiale de 0,1. Le milieu de culture n'est pas préchauffé à 37 °C avant son utilisation ce qui peut occasionner des différences de temps de culture en fonction de la température du laboratoire. La densité optique est donc utilisée pour mieux suivre la culture, étant donné qu'elle est directement proportionnelle à la quantité de bactéries. Il est à noter que l'ajout d'acides gras et de DPC peut également faire augmenter la densité optique de 0,1-0,2.

Tel que présenté à la figure 3.1, la phase de latence dure environ 1h où les bactéries s'acclimatent aux nouvelles conditions de culture. Ensuite, la culture entre dans une phase logarithmique qui est divisée en trois paliers (début, mi et fin). Lorsque le milieu de culture est épuisé, les bactéries entrent dans la phase plateau.

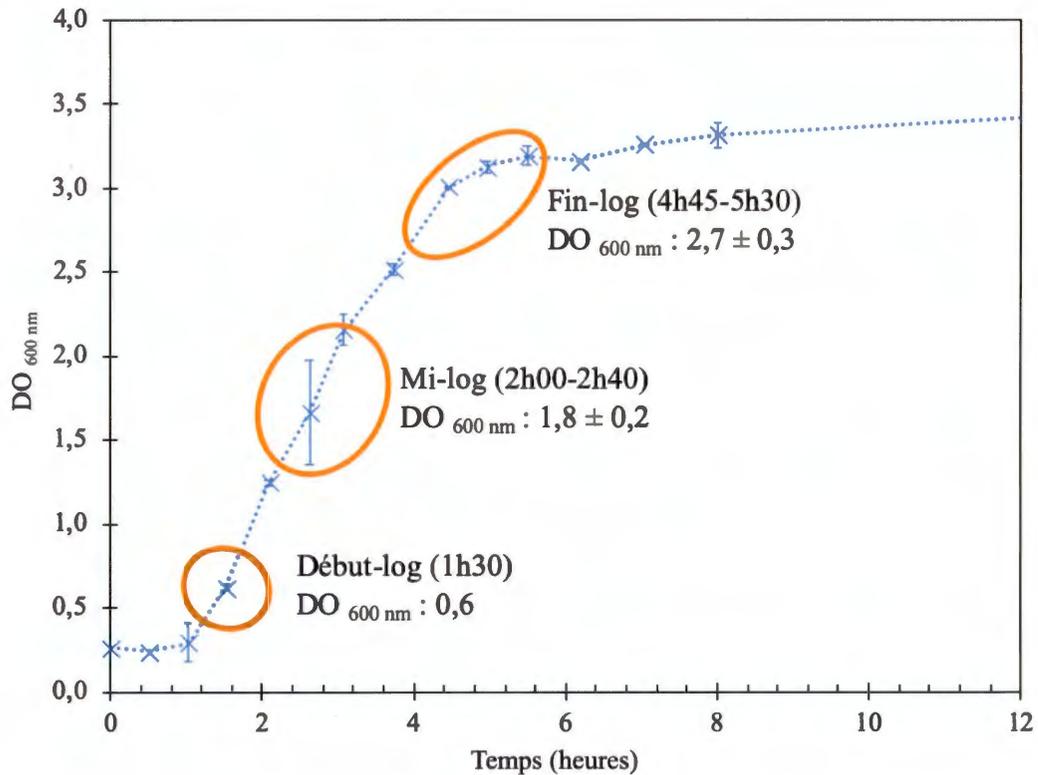


Figure 3.1 Courbe de croissance d'*E. coli* dans le milieu LB à 37 °C (220 rpm) avec acides palmitique et oléique à 0,19 mM

La courbe de croissance a été obtenue avec la moyenne et l'écart-type d'un duplicata effectué dans les mêmes conditions qu'un marquage en erlenmeyer dans l'incubateur. Il est à noter que la culture a fréquemment été sortie de l'incubateur et peut avoir été refroidie pendant les manipulations. La détermination de la courbe n'a pas été effectuée en microplaque afin d'être plus représentative des conditions de marquage.

Le marquage des membranes des bactéries a été étudié pour les trois paliers de la phase de culture logarithmique. Les bactéries cultivées dans le milieu de culture (LB) supplémenté en PA-d<sub>31</sub> et OA ont donc été récoltées lorsqu'elles ont atteint la densité optique indiquée à la figure 3.1. Le spectre RMN-<sup>2</sup>H ainsi que les seconds moments calculés, pour des bactéries fraîches, sont présentés à la figure 3.2.

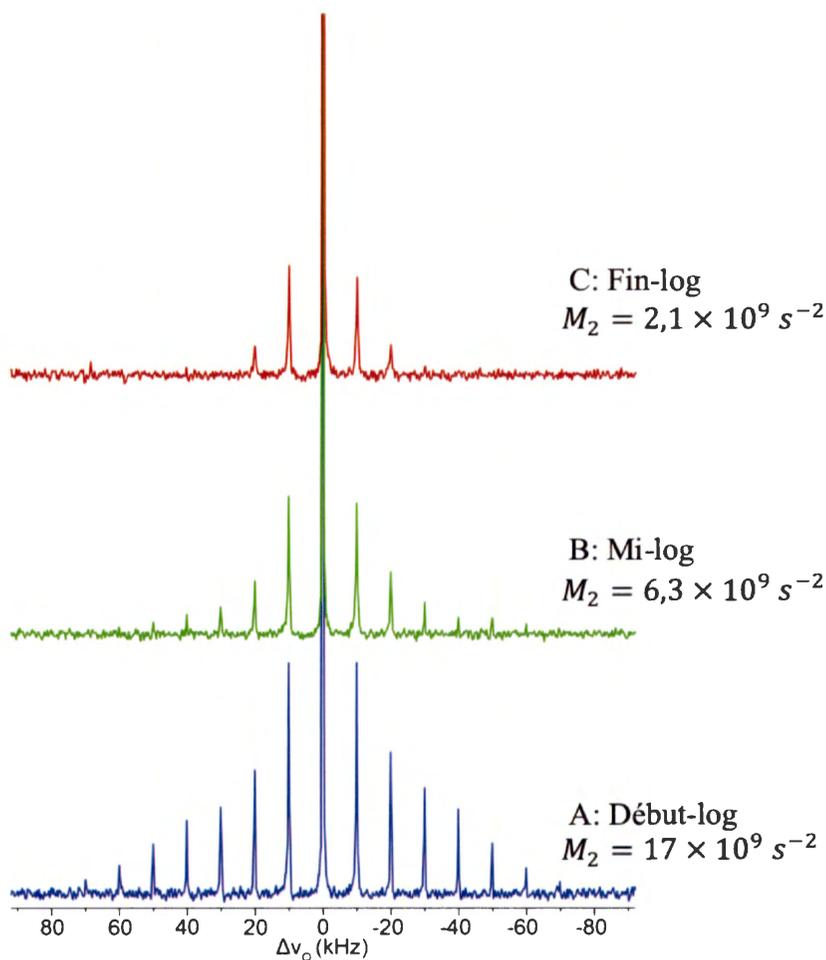


Figure 3.2 Spectre RMN  $^2\text{H}$  d'*E. coli* à différentes phases de croissances, marquée avec 0,19 mM de PA- $\text{d}_{31}$  et de OA à 37 °C. MAS à 10 kHz.

Le spectre A de la figure 3.2 est celui de la culture au début de la phase log. Il est large et présente un second moment de  $17 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ . Plus la culture est récoltée tard, plus la membrane se fluidifie. En effet, le second moment de la culture à la fin de la phase log a un second moment de  $2,1 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ . Le changement de fluidité en fonction de la phase de croissance d'une bactérie a également été observé avec *Vibrio splendidus* par Bouhleb *et al.* [14].

Il est déjà établi dans la littérature que l'ajout d'acide oléique froid à l'acide palmitique marqué est nécessaire pour obtenir une membrane fluide [8, 17]. Mais nous observons ici qu'une membrane rigide peut aussi être obtenue, malgré une supplémentation d'acide gras insaturé (voir Figure 3.2.A). Cette observation soulève la question des différents facteurs pouvant contribuer à la rigidification de la membrane bactérienne: concentration de lipides utilisés pour le marquage, processus biochimiques de la bactérie, autoassemblage des micelles d'acides gras saturés et insaturés avec la DPC, affinité avec le FadL [40], *etc.* Il est également reconnu qu'*E. coli* amorce la synthèse d'acides gras cyclopropylés à la fin de la phase de croissance exponentielle (fin-log) [38]. Ces acides gras peuvent aider à fluidifier la membrane. La bactérie a également l'option de consommer les acides gras de sa propre membrane lorsqu'elle est déplétée en nutriments [69]. Est-il possible que la membrane au début de la phase log puisse être surchargée et donc rigide? La figure 3.3 appuie cette dernière hypothèse. En effet, une fois que la bactérie est incubée dans un milieu déplété en nutriment (saline), sa membrane se fluidifie. Pour mieux comprendre ce phénomène, une analyse du profil d'acides gras de la culture suite au marquage avec différentes concentrations à mi-log et fin-log est présentée dans la section 3.1.2.

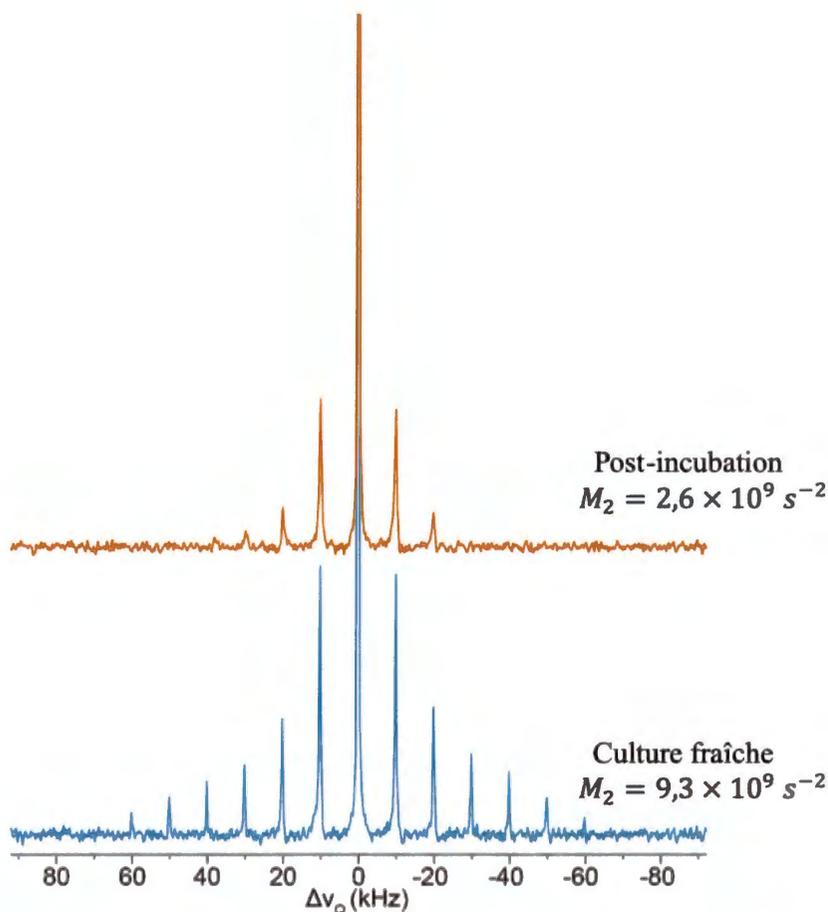


Figure 3.3 Spectre RMN  $^2\text{H}$  d'*E. coli* à 37 °C marquée à 0,19 mM PA- $\text{d}_{31}$  et OA à la phase mi-log. Culture fraîche (en bas). Culture incubée à 37 °C pendant 2h30 dans une saline (en haut). MAS à 10 kHz.

La RMN- $^2\text{H}$  a souvent été utilisée pour mesurer la fluidité de membranes artificielles à plusieurs températures avec, par exemple, la 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine deutérée sur les deux palmitates (DPPC- $\text{d}_{62}$ ). Warnet *et al.* [15] ont déterminé que le  $M_2$  d'une membrane de DPPC- $\text{d}_{62}$  en phase gel est de l'ordre de  $40 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ , alors qu'il est de  $3 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ , en phase fluide. Depuis quelques années, nous mesurons la fluidité de membranes bactériennes, et son évolution sous l'effet de plusieurs facteurs (température, conditions de croissance, ajout de nanoparticules, drogues, *etc.*).

Pour cela, nous devons marquer la membrane bactérienne avec des acides gras deutérés, mais nous ne savons pas si ce marquage perturbe la fluidité « native » de la membrane, et nous ne pouvons pas savoir quelle sera la valeur du  $M_2$  d'une membrane native. C'est donc par déductions successives que nous cherchons les conditions de marquage les moins perturbantes pour la bactérie, qui permettra de déterminer un  $M_2$  que nous supposons le plus proche des conditions natives. C'est ce que nous avons déjà commencé à étudier dans les précédents travaux de Bouhleb *et al.* [14], et que nous allons étudier ici plus exhaustivement, en cherchant à préserver le profil d'acides gras et, en particulier, le rapport d'acides gras saturés/insaturés, à optimiser le taux de marquage, et à obtenir une fluidité native.

### 3.1.2 Effet de la concentration en acides gras exogènes ajoutés

Comme soulevé précédemment, la quantité d'acides gras exogènes ajoutée au milieu de culture peut affecter la rigidité de la membrane, mais aussi sa composition. La concentration de 0,19 mM d'acides gras exogènes (PA-d<sub>31</sub> et OA) est la dernière utilisée par le laboratoire [15] et des concentrations inférieures ont été explorées dans cette étude soit 0,05 mM, 0,10 mM et 0,19 mM. De plus, l'impact du marquage a été évalué pour ces trois concentrations sur deux niveaux de la phase de croissance, soient mi-log et fin-log via le profil d'acides gras analysé par GC-MS, tel que présenté dans cette section. Les taux de marquage sont détaillés dans la section (3.1.3). Les  $M_2$  de ces échantillons sont présentés dans la prochaine section (3.1.4).

Dans un premier temps, les valeurs du profil d'acides gras pour la phase de croissance mi-log sont présentées dans le tableau 3.1 et également à la figure 3.4. Des répliquats devraient être effectués sur le témoin.

Tableau 3.1 Profil d'acides gras en pourcentage relatif molaire, ratio d'acides gras saturés/insaturés et pourcentage de deutération du témoin et de la bactérie marquée à différentes concentrations d'acides gras exogènes (PA-d<sub>31</sub> et OA) à la phase mi-log

Acides gras	Témoin	0,05 mM	0,10 mM	0,19 mM
C14:0	2,6	1,5 (0,1)	1,3 (0,1)	1,5 (0,1)
C16:0	33,1	43,9 (4,1)	44,3 (4,1)	48,1 (6,1)
cyC17:0	18,0	10,7 (4,1)	9,1 (3,1)	7,9 (2,1)
C18:0	0,5	1,1 (1,1)	1,0 (1,1)	0,8 (0,1)
C18:1	32,3	40,7 (1,1)	42,2 (2,1)	40,4 (5,1)
cyC19:0	5,8	2,2 (1,1)	1,9 (1,1)	1,4 (0,1)
Autres	7,8	- -	0,0 (0,1)	- -
Saturés	36,2	46,4 (5,1)	46,7 (4,1)	50,3 (7,1)
Insaturés	63,8	53,6 (5,1)	53,3 (4,1)	49,7 (7,1)
ratio Sat./Insat.	0,6	0,88 (0,12)	0,88 (0,11)	1,04 (0,13)
Marquage C16:0 (%)	-	47,6 (7,1)	55,9 (8,1)	55,7 (11,1)
Marquage total (%)	-	21,1 (5,1)	25,0 (5,1)	27,2 (9,1)

Les concentrations de PA-d<sub>31</sub> et OA sont équimolaires, le total des acides gras ajoutés est le double de la valeur indiquée. Le profil d'acides gras pour les concentrations de 0,05 mM, 0,10 mM et 0,19 mM sont effectués sur trois réplicats, alors que le témoin est effectué sur un seul réplicat. Le marquage est présenté sur l'acide palmitique froid et deutéré (C16:0) et sur tout le profil d'acides gras (total). Le nombre entre parathèse est l'écart-type calculé sur les réplicats qui est représenté dans les barres d'erreur de la figure suivante. Un exemple de chromatogramme pour la concentration de 0,19 mM est présenté en annexe B (Chromatogramme B.1).

Dans les autres acides gras du témoin, 8 % de C16:1 sont observés et ne sont plus apparents suite aux marquages. Il est à noter que cet acide gras à un temps de rétention semblable à PA-d<sub>31</sub>, par contre son ion moléculaire n'est seulement détecté qu'à l'état de trace dans le pic deutéré.

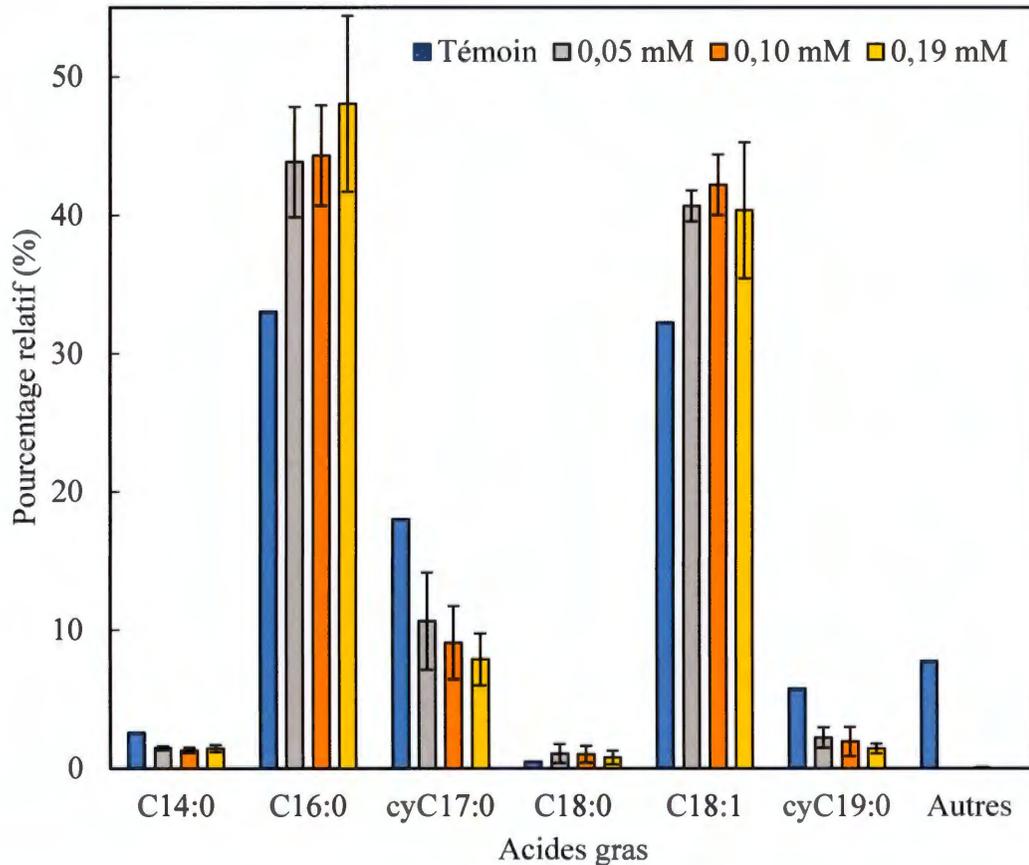


Figure 3.4 Profil d'acides gras (pourcentage molaire relatif) du témoin et de la bactérie marquée avec 0,05 mM, 0,10 mM et 0,19 mM d'acides gras exogènes récoltés à la phase mi-log.

Aucun changement drastique du profil d'acides gras n'est apparent à la figure 3.4 entre les concentrations d'acides gras exogènes évaluées. Par rapport au témoin, le marquage provoque une augmentation d'environ 10 % des C16:0 et des C18:1 avec une grande variabilité de 5 %. La variabilité peut dépendre de l'incorporation de ces acides gras. Une réduction des acides gras cyclopropylés est observée. Le ratio de lipides saturés/insaturés est de 0,6 pour le témoin et grimpe à 0,9 pour le marquage avec les concentrations de 0,05 mM et 0,10 mM. Ce ratio augmente à 1 pour la concentration de 0,19 mM. Un ratio supérieur à 1 peut rigidifier la membrane.

Le tableau 3.1 présente le profil d'acide gras, où les C16:0 incluent l'acide palmitique froide et deutérée (PA-d<sub>31</sub>). Dans ce cas, le taux de marquage total est uniquement celui du PA-d<sub>31</sub>. Le taux de marquage en PA-d<sub>31</sub> est meilleur, soit de 25 % et 27 % pour les concentrations de 0,10 mM et 0,19 mM contre 21 % pour la concentration de 0,05 mM. L'écart-type pour le taux de marquage est plus élevé pour le marquage à 0,19 mM que pour les concentrations plus faibles, soit de 9 % contre 5 %. L'incorporation de PA-d<sub>31</sub> n'est donc pas constante.

Par la suite, le profil d'acides gras a également été évalué sur les bactéries récoltées à la fin de la phase log tel que présenté dans le tableau 3.2. Les valeurs sont également présentées à la figure 3.5.

En comparaison avec la culture à la phase mi-log, il y a une diminution d'environ 5 à 10 % des C16:0 et de 10 % des C18:1 pour les cultures en fin-log. Une augmentation d'environ 10 % des cyC17:0 et des cyC19:0 est notée en fin-log. Cette augmentation d'acides gras endogènes considérés comme insaturés est peut-être suffisante et l'apport exogène d'acide oléique n'est peut-être pas nécessaire pour la phase de culture fin-log.

Tableau 3.2 Profil d'acides gras en pourcentage relatif molaire, ratio d'acides gras saturés/insaturés et pourcentage de deutération du témoin et de la bactérie marquée à différentes concentrations d'acides gras exogènes (PA-d<sub>31</sub> et OA) à la phase fin-log

Acides gras	Témoin	0,05 mM	0,10 mM	0,19 mM
C14:0	4,3 (0,1)	2,1 (0,1)	3,2 (0,1)	2,0 (0,1)
C16:0	35,5 (1,1)	36,9 (4,1)	39,3 (0,1)	37,8 (1,1)
cyC17:0	27,1 (0,1)	16,0 (2,1)	14,1 (0,1)	16,6 (1,1)
C18:0	0,9 (0,1)	1,5 (1,1)	0,9 (0,1)	0,4 (0,1)
C18:1	13,1 (1,1)	33,6 (4,1)	28,3 (3,1)	29,8 (2,1)
cyC19:0	16,8 (1,1)	9,7 (3,1)	13,8 (2,1)	13,3 (2,1)
Autres	2,4 (1,1)	0,2 (0,1)	0,4 (0,1)	0,1 (0,1)
Saturés	41,7 (1,1)	40,7 (4,1)	43,7 (1,1)	40,3 (2,1)
Insaturés	58,3 (1,1)	59,3 (4,1)	56,3 (1,1)	59,7 (2,1)
Ratio Sats/Insat.	0,71 (0,1)	0,69 (0,1)	0,78 (0,10)	0,68 (0,10)
Marquage				
C14:0	- -	38,2 (8,1)	70,3 (3,1)	39,2 (25,1)
C16:0	- -	39,6 (4,1)	53,7 (3,1)	54,1 (9,1)
Total	- -	15,5 (2,1)	23,3 (2,1)	21,4 (5,1)

Les concentrations de PA-d<sub>31</sub> et OA sont équimolaires, le total des acides gras ajoutés est le double de la valeur indiquée. Le profil d'acides gras pour le témoin (sans marquage) et la concentration de 0,10 mM sont effectués en quatre répliquats. La concentration de 0,05 mM et 0,19 mM sont effectués en trois répliquats. Le marquage est présenté sur l'acide myristique et palmitique froid et deutéré (C14:0 et C16:0) et sur tout le profil d'acides gras (total). Le nombre entre parathèse est l'écart type calculé sur les répliquats qui est représenté dans les barres d'erreurs de la figure suivante. Un exemple de chromatogramme pour la concentration de 0,19 mM est présenté en annexe B (Chromatogramme B.2).

Des C14:0 deutérés ont été détectés dans les cultures en phase fin-log par spectrométrie de masse, ce qui témoigne donc du catabolisme du PA-d<sub>31</sub> par la bactérie. Cette observation prouve que la bactérie adapte son profil d'acides gras en fonction de sa croissance.

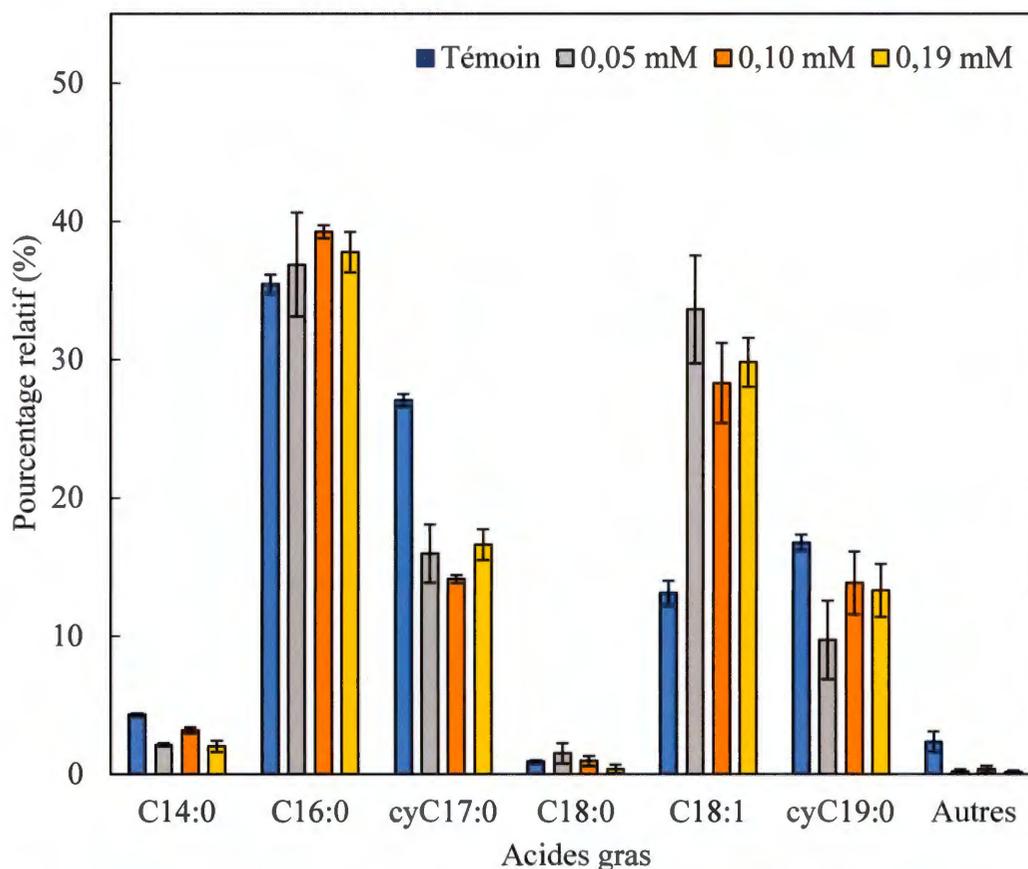


Figure 3.5 Profil d'acides gras (pourcentage molaire relatif) du témoin et de la bactérie marquée avec 0,05 mM, 0,10 mM et 0,19 mM d'acides gras exogènes et récoltée à la phase fin-log.

En comparant le profil d'acides gras avec le témoin, il y a une diminution des cyC17:0 qui est bien compensée par une augmentation des C18:1. Le ratio de lipides saturés/insaturés est stable autour de 0,7 pour les trois concentrations ainsi que le témoin. Il ne semble pas y avoir de différence sur le marquage pour une concentration supérieure à 0,10 mM soit environ 22 % contre 16 % à 0,05 mM. Il semble donc plus adéquat de récolter les bactéries à cette phase de croissance, car le ratio lipidique est mieux respecté.

### 3.1.3 Taux de marquage au $^2\text{H}$

Le taux de marquage pour les trois concentrations de lipides exogènes et les deux différentes phases de culture sont présentés à la figure 3.6. Les informations sont tirées des tableaux 3.1 et 3.2.

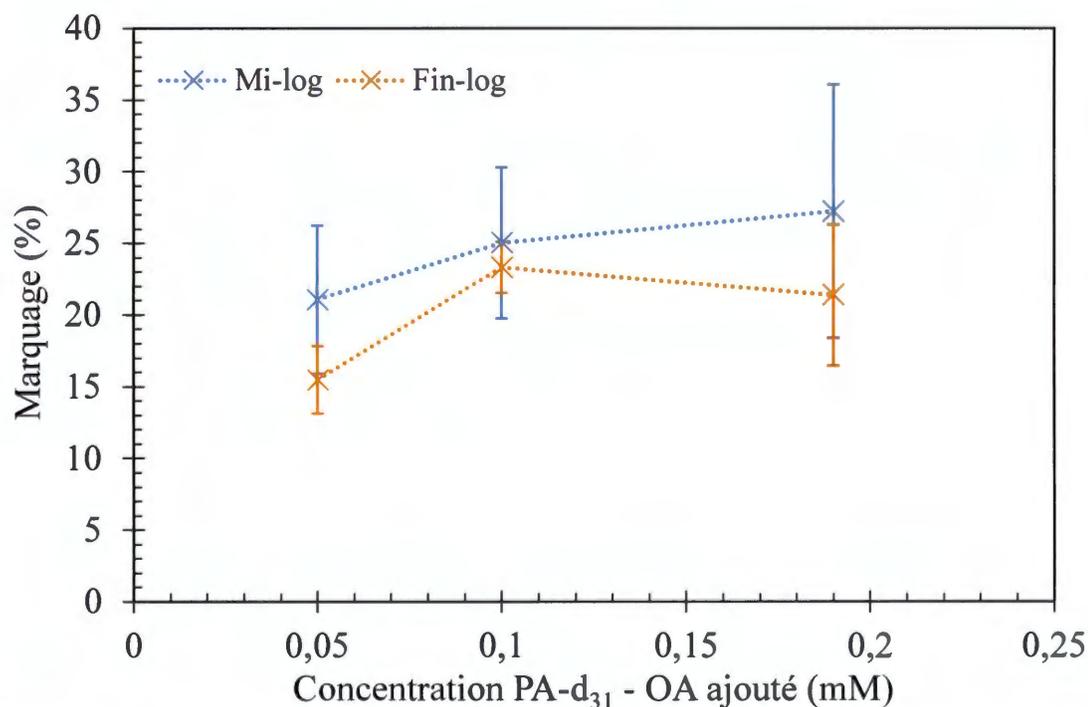


Figure 3.6 Pourcentage de marquage (C14:0 et C16:0 deutérés) pour la phase mi-log ainsi que la fin-log.

Les concentrations de PA-d<sub>31</sub> et OA sont équimolaires, le total des acides gras ajoutés est le double de la valeur indiquée. Le taux de marquage est calculé avec la somme des C14:0 deutérée et C16:0 deutéré, détecté par GC-MS sur le profil des acides gras. Les valeurs sont extraites des tableaux 3.1 et 3.2.

Le taux de marquage est d'environ 5 % inférieur en phase de croissance fin-log comparativement à la phase mi-log. Il est à noter que l'écart-type est plus important pour les concentrations de 0,19 mM pour les deux phases de croissance. De plus, l'écart-type du marquage des bactéries récoltées à la fin de la phase log est plus petit.

### 3.1.4 Fluidité membranaire

Suite au marquage avec les différentes concentrations d'acides gras utilisées, un spectre RMN-<sup>2</sup>H a été effectué sur les cultures fraîches afin de déterminer les effets sur la fluidité membranaire des cellules d'*E. coli*. Le second moment mesuré sur les spectres est indiqué dans le tableau 3.3 ainsi que présenté à la figure 3.7.

Tableau 3.3 Second moment ( $10^9 \text{ s}^{-2}$ ) moyen des cultures en phase mi-log et fin-log avec le marquage à trois concentrations de PA-d<sub>31</sub> et OA

Concentration (mM)	Mi-log	Fin-log
0,05	1,90 (0,37)	2,02 (0,14)
0,10	1,89 (0,62)	2,19 (0,12)
0,19	6,87 (5,00)	2,06 (0,60)

Pour la phase de croissance mi-log et fin-log, la concentration de 0,05 mM a été effectuée en 3 réplicats, et la concentration de 0,19 mM en 4 réplicats. La concentration de 0,10 mM a été effectuée à 4 réplicats pour la phase de croissance mi-log et à 5 réplicats pour la phase de croissance fin-log. Un tableau détaillé des conditions de cultures ainsi que de chaque réplicat est présenté aux annexes B.1 et B.2. Un tableau résumant les densités optiques utilisé est également présenté en annexe B.3.

La figure 3.7 témoigne d'une grande variabilité pour la concentration de 0,19 mM à la phase de croissance mi-log. Le temps de préparation de l'échantillon peut varier de 1h30 à 2h30, en fonction du manipulateur (stagiaire et précédents du marquage). Ce délai est peut-être significatif pour le catabolisme de l'acide palmitique qui peut ensuite modifier le profil d'acides gras et donc sa fluidité membranaire. Les micelles d'acides gras équimolaires sont solubilisées avec trois cycles de gel et dégel dans le milieu de culture avec la DPC avec une concentration 12,5 fois supérieure. Il est possible que la température de cette solution concentrée ait une incidence sur les objets formés dans le milieu de culture lorsqu'ils y sont dissouts. Cette hypothèse pourrait être étudiée par titrage calorimétrique isotherme (ITC) ainsi que par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Une liste de paramètres investigués pour comprendre pourquoi la membrane peut être parfois rigide est disponible en annexe C

Pour les concentrations de 0,05 mM et 0,10 mM, le second moment est stable autour de  $2 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  pour les deux phases de culture. Parfois la membrane est fluide et d'autres fois, rigide à la phase mi-log à une concentration de 0,19 mM avec un second moment de plus de  $10 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ . Il est à noter que le ratio de lipides saturés/insaturés est supérieur à 1 lorsque la membrane est rigide. Il est possible que la bactérie ait plus de facilité à incorporer l'acide palmitique qu'oléique pour cette concentration et phase de culture. La concentration de 0,19 mM est également de  $2 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  pour la phase de culture fin-log.

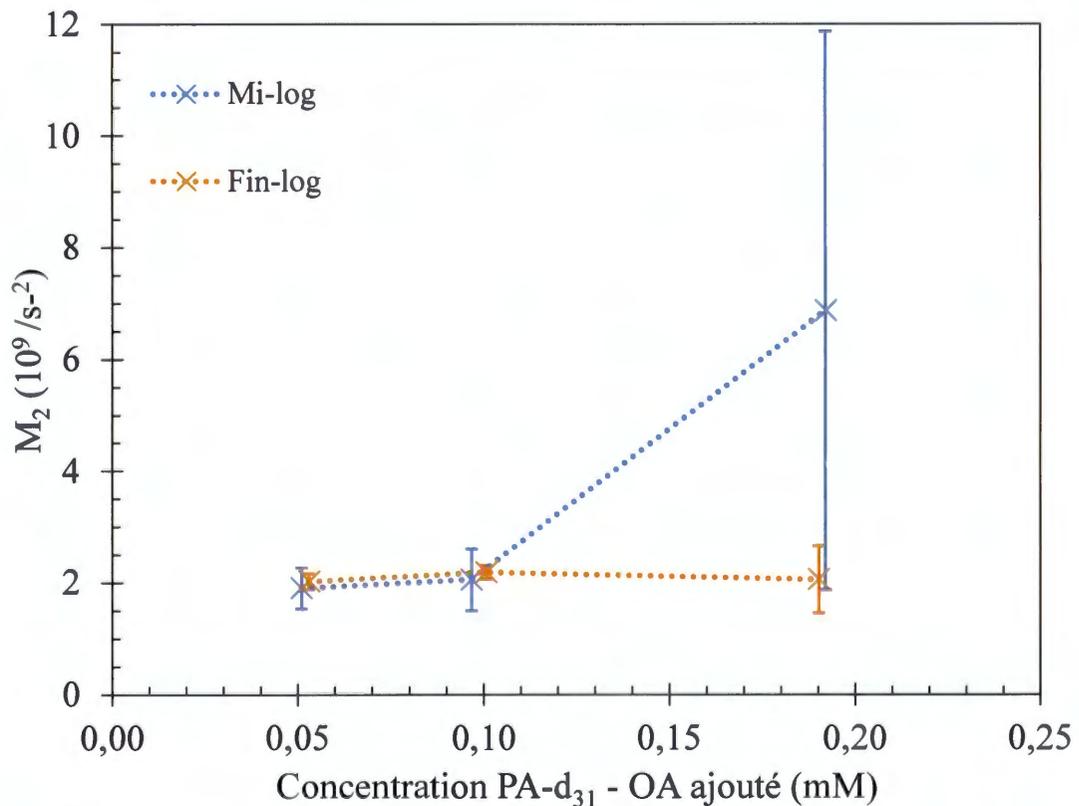


Figure 3.7 Second moment moyen ( $M_2$ ) des cultures fraîches d'*E. coli* en fonction de la concentration (mM) de PA-d<sub>31</sub> et OA ajoutés à la culture, récoltée à la phase mi-log et fin-log.

### 3.1.5 Synthèse des résultats

En moyenne, le ratio de lipides saturés/insaturés est inférieur à 1 pour toutes les conditions de culture, sauf pour la concentration de 0,19 mM lorsque les bactéries sont récoltées à la phase de croissance mi-log pour laquelle le ratio est de 1,0 (0,1). Il est donc parfois supérieur ou inférieur à 1, alors cette condition de culture est à éviter. Une membrane fluide avec un second moment autour de  $2 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  est attendu.

Pour le marquage à la phase mi-log et fin-log, il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de 0,10 mM et 0,19 mM. À mi-log, un marquage de 26 % est obtenu pour les deux concentrations, et de 22 % à la fin-log. Bien que le marquage soit 5 % inférieur lorsque la culture est récoltée à la phase de croissance mi-log, la phase fin-log offre des données moins variables pour le second moment ainsi que pour le profil d'acides gras.

Pour réaliser un marquage au  $^2\text{H}$  endogène d'*E. coli*, les résultats indiquent que les bactéries doivent être récoltées à la phase de croissance fin-log et qu'une concentration de 0,10 mM en PA-d<sub>31</sub> et de 0,10 mM en OA est considérée comme optimale en plus d'être plus économique.

## 3.2 Comparaison des marquages exogène et endogène d'*E. coli*

Les conditions de marquage idéales des lipides d'*E. coli* ont été déterminées dans la section précédente avec l'utilisation d'acides gras exogènes commerciaux. Dans cette section, des acides gras endogènes sont caractérisés ainsi qu'exploités. Ces derniers sont extraits de cultures d'*E. coli* perdeutérées. Par la suite, nous allons comparer les marquages exogènes et endogènes à la fin de la phase exponentielle à une concentration de 0,10 mM. Pour ce faire, trois réplicats des marquages exogènes et endogènes sont

comparés sur la base de leurs profils d'acides gras, taux de marquage, fluidité membranaire et leur viabilité. L'hypothèse est que le marquage endogène aura un profil d'acides gras plus proche de la membrane naturelle et aura une fluidité membranaire plus native.

### 3.2.1 Caractérisation des lipides de marquage

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les acides gras deutérés employés pour chacun des marquages. En ce qui concerne le marquage exogène, nous avons déterminé que la concentration optimale à utiliser est de 0,1 mM d'acide palmitique perdeutééré et d'acide oléique commerciaux. Une analyse de GC-MS sur les acides gras exogènes utilisés ne révèle aucune impureté ni traces de C14:0 deutéré.

Pour le marquage endogène, les lipides ont été biosynthétisés par la même souche *d'E. coli* dans un milieu préparé avec de l'eau lourde, récoltée dans la phase plateau, tel que présenté dans la section 2.1.3. Lors du développement méthodologique, un spectre de RMN-<sup>2</sup>H de l'état solide a été effectué sur un réplikat des bactéries cultivées dans le milieu LR D<sub>2</sub>O à 70 %, tel que présenté à la figure 3.8. Les lipides extraits de ce réplikat ont ensuite été caractérisés par RMN en solution à la figure 3.9 et 3.10. Par la suite, un plus grand lot de bactéries perdeutéérées a été produit dans un second réplikat. Le profil d'acides gras et le marquage endogène du reste de la section, soit de 3.2.2 à 3.2.6, ont été effectués à partir de ce dernier réplikat.

Avec la figure 3.8, nous pouvons confirmer que le D<sub>2</sub>O a été incorporé dans les composantes structurelles de la bactérie. Le D<sub>2</sub>O liquide aurait une largeur spectrale de moins de 1 kHz. Le spectre obtenu a plutôt une largeur de 140 kHz. Il est à noter que le signal provient non seulement des lipides, mais aussi des protéines, sucres et toutes autres molécules bactériennes deutérées.

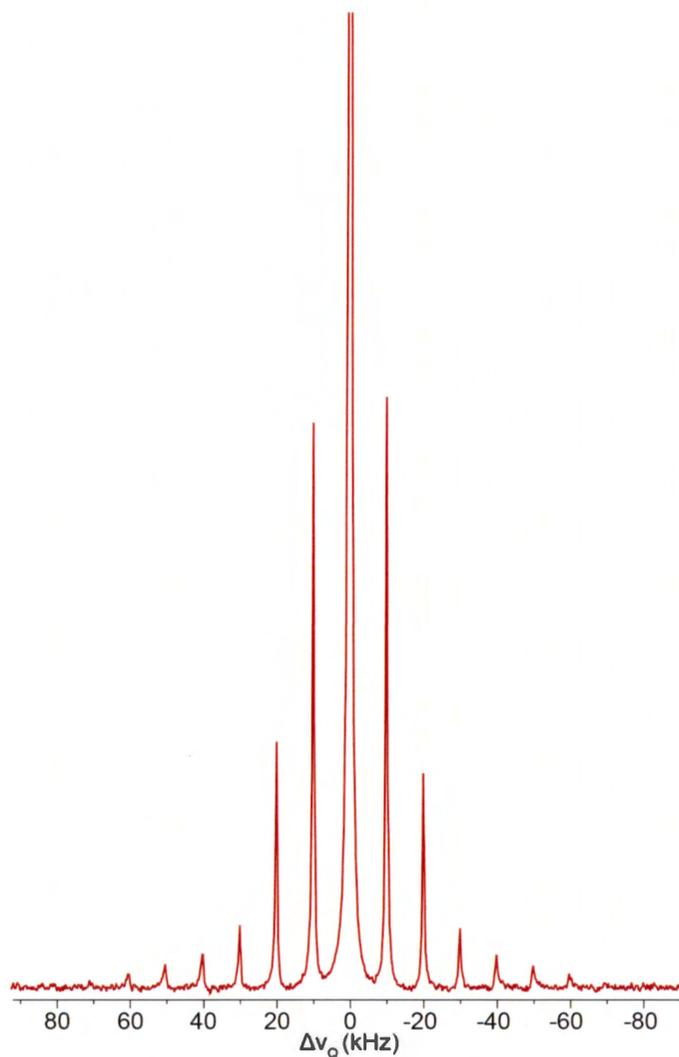


Figure 3.8 Spectre de RMN  $^2\text{H}$  sur des cellules d'*E. coli* fraîches entièrement deutérées, avec MAS à 10 kHz.

Les lipides extraits de la bactérie marquée ont été caractérisés par RMN en solution, tel que présenté à la figure 3.9. Les deux spectres ont été référencés sur le signal du chloroforme deutéré à 7,28 ppm. Les interactions quadripolaires qui élargissent le signal du  $^2\text{H}$  sont annulées par les mouvements moléculaires rapides en solution. Le deutérium (en vert) offre alors ses fréquences de déplacement chimique qui épousent celles du proton (en bleu). Le signal peut être élargi par un couplage scalaire entre le proton et le deutérium.

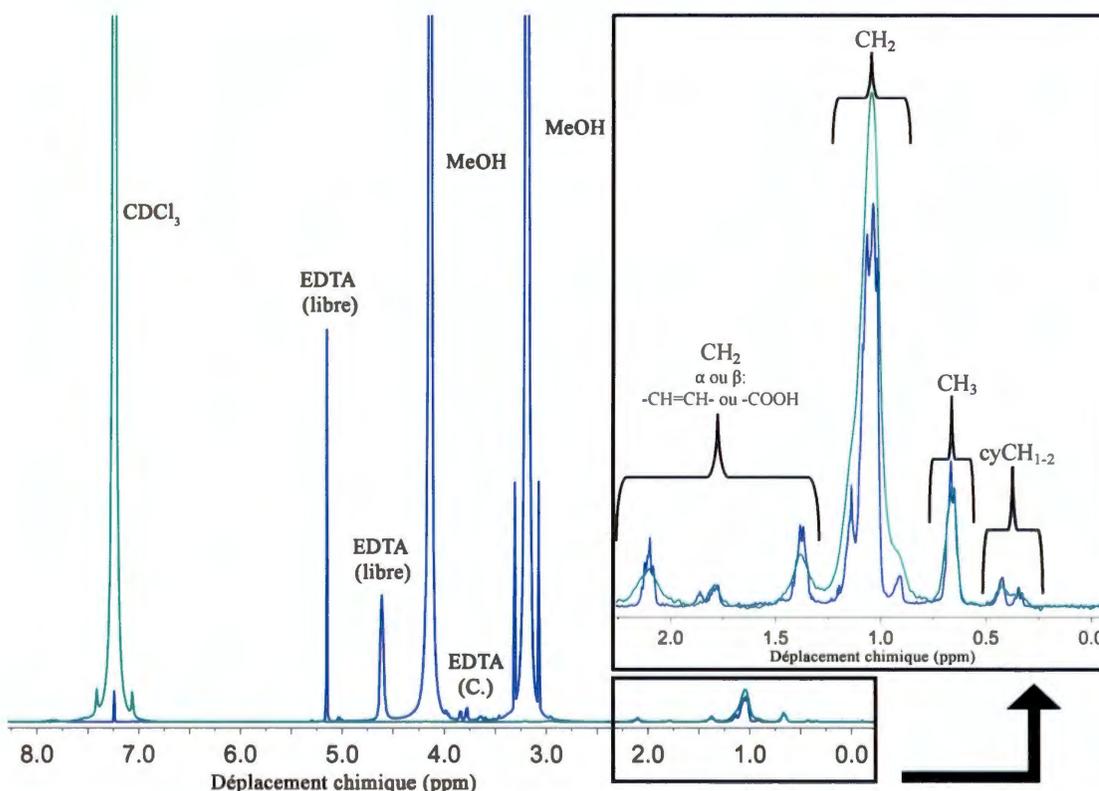


Figure 3.9 Spectre de RMN en solution des lipides produits par *E. coli* cultivée dans le milieu LR D<sub>2</sub>O 70 %. Bleu : spectre du proton. Vert : spectre du deutérium (500  $\mu$ L CDCl<sub>3</sub>, 200  $\mu$ L MeOH et 50  $\mu$ L KOH-EDTA 200 mM pH 6).

Il est à noter que la composition du système de solvants utilisés est optimisée pour l'analyse des têtes polaires en RMN du phosphore [61, 62, 70]. Le spectre <sup>1</sup>H est dominé par le méthanol froid ainsi que la solution d'EDTA. Lors de l'acquisition du spectre proton, le signal est verrouillé sur le signal du chloroforme deutéré via le canal du deutérium. Une seconde acquisition du canal deutérium a été effectuée pour mettre en évidence la deutération des lipides produits par *E. coli*. Cette acquisition, non conventionnelle, n'est pas verrouillée et offre donc un signal plus large. La portion du spectre au-delà de 3 ppm est moins utilisable en raison des signaux intenses des composantes du solvant.

Les signaux les plus blindés sont ceux des cyclopropyles (0 à 0,5 ppm). Dans la portion de 0,5 à 1,25 ppm, nous pouvons voir les signaux des groupements méthyles ainsi que des méthylènes propres aux chaînes acyles. Les signaux de 1,25 à 2,25 ppm sont caractéristiques des méthylènes déblindés en  $\alpha$  ou  $\beta$  d'une insaturation ou bien d'une fonction carboxylique. Ces observations nous permettent de confirmer que les chaînes acyles sont bien deutérées ainsi que protonées.

Le mélange a également été analysé à la fréquence du phosphore à la figure 3.10 afin de déterminer le profil de têtes polaires du mélange de lipides à titre informatif. Le pourcentage molaire des phospholipides est présenté dans le tableau 3.4.

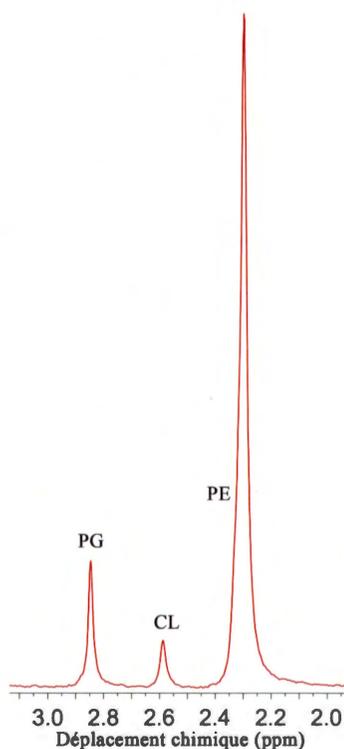


Figure 3.10 Spectre de RMN  $^{31}\text{P}$  en solution des lipides produits par *E. coli* cultivée dans le milieu LR D<sub>2</sub>O 70% (500  $\mu\text{L}$  CDCl<sub>3</sub>, 200  $\mu\text{L}$  MeOH et 50  $\mu\text{L}$  KOH-EDTA 200 mM pH 6).

Le signal du phospholipide le plus intense (PE) a été utilisé pour référencer le spectre à 2,3 ppm selon l'article de Lutz *et al.* [62].

Tableau 3.4 Profil des têtes polaires des phospholipides extraits d'*E. coli* deutérée

Phospholipide	Pourcentage molaire (%)
PE	87
PG	11
CL	2

L'intégration des trois pics de la figure 3.10 a été utilisée pour calculer le pourcentage molaire des phospholipides. L'intégration du signal de la cardiolipine est donc divisée par deux en raison de ses deux groupements phosphates.

Tel que présenté dans la section (1.5.2), la PE est normalement retrouvée jusqu'à 80 % [8, 36, 37]. La bactérie a donc produit plus de PE en abaissant la proportion des deux autres phospholipides. Notre hypothèse est que la deutération ou le milieu de culture minimal ont possiblement stressé la bactérie.

Le profil d'acides gras d'un second réplikat des bactéries deutérées ainsi que des bactéries froides sont présentées à la figure 3.11 ainsi que dans le tableau 3.5. Le profil des têtes polaires n'a pas été effectué sur ce réplikat pour garantir un meilleur rendement.

Tableau 3.5 Profil d'acides gras en pourcentage molaire relatif de la bactérie deutérée comparé au témoin

Acides gras	Bactérie froide	Bactérie deutérée
C14:0	4,3 (0,1)	6,5
C16:0	35,5 (1,1)	36,8
cyC17:0	27,1 (0,1)	35,2
C18:0	0,9 (0,1)	1,2
C18:1	13,1 (1,1)	3,4
cyC19:0	16,8 (1,1)	16,1
Autres	2,4 (1,1)	0,9
Saturés	41,7 (1,1)	44,7
Insaturés	58,3 (1,1)	55,3
Ratio Sat./Insat.	0,71 (0,1)	0,81

Le profil des acides gras de la bactérie froide est calculé sur 4 réplicats et sur un seul réplicat pour la bactérie deutérée.

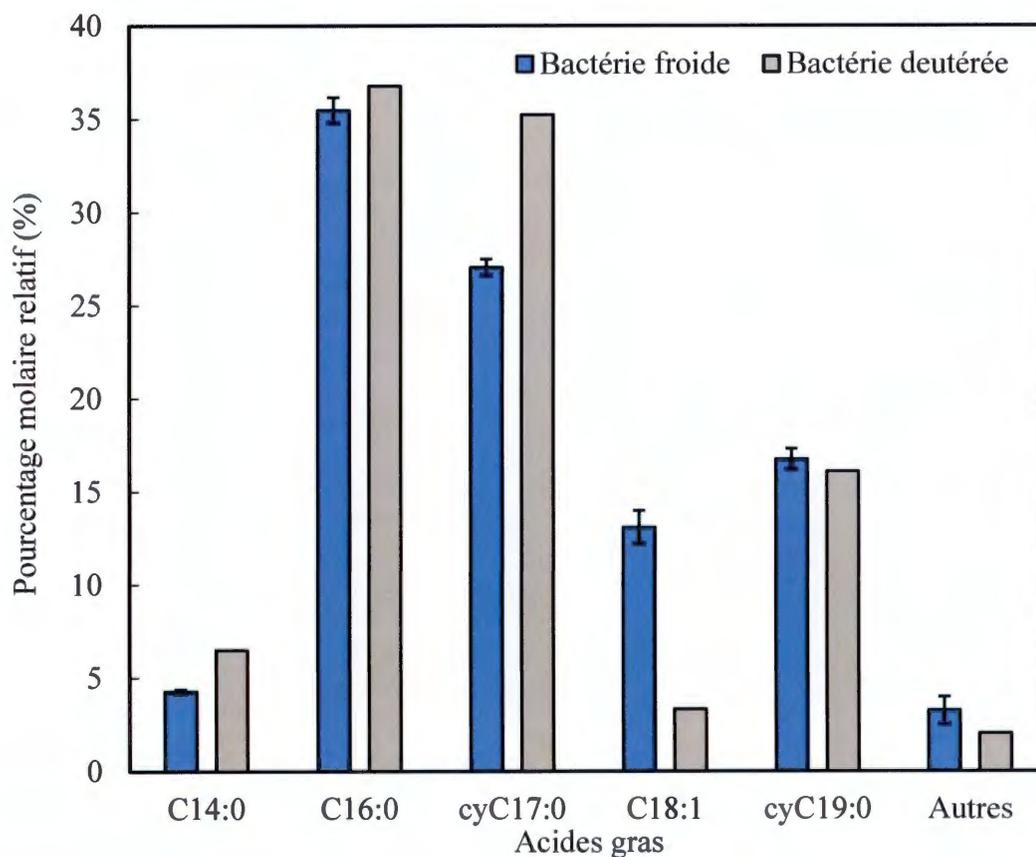


Figure 3.11 Profil d'acides gras de la bactérie deutérée (milieu LR D<sub>2</sub>O 70 % récoltée à la phase plateau) comparé à une culture témoin (milieu LB H<sub>2</sub>O récoltée à la phase fin-log).

La deutération a possiblement stressé la bactérie, ou les différences observées peuvent être attribuées au milieu de culture minimal et à la phase de croissance. En effet, il y a une différence de 10 % pour les C18:1 et les cyC17:0. Afin d'analyser l'effet de la deutération, des répliquats du profil d'acide gras des bactéries dans le milieu minimal LR récoltées à la phase plateau devraient être effectués. Néanmoins, cette différence ne pose pas de problème au niveau de l'impact sur la fluidité membranaire, car ces deux acides gras sont considérés comme insaturés.

Il y a une augmentation de 3 % de lipides saturés via les C14:0 et les C16:0. Cette augmentation affecte le ratio de lipides saturés/insaturés qui augmente à 0,8 contre 0,7 (0,1) du témoin. Cette différence est cependant minime et dans la barre d'erreur typique pour ce genre d'analyses.

Les pourcentages relatifs molaires des acides gras partiellement deutérés sont présentés dans le tableau 3.6 ainsi que leurs masses molaires moyennes avec leurs pourcentages de deutération de chaque acide gras. La masse pondérée est utilisée afin de calculer la masse molaire moyenne de ce mélange d'acides gras.

Tableau 3.6 Analyse des acides gras deutérés utilisés pour le marquage endogène

Acides gras	Pourcentage relatif molaire des acides gras	Masse molaire moyenne / AG (g/mol)	Deutération moyenne / AG (%)	Masse pondérée (g/mol)
C14:0-d	6,5	244	57,0	15,9
C16:0-d	36,3	274	58,1	99,6
cyC17:0-d	35,2	285	54,8	100,4
C18:1-d	2,9	305	60,6	8,9
cyC19:0-d	16,1	317	60,0	51,0
Autres	2,9	280	-	8,1
Somme	100	-		283,9

La notation (-d) signifie deutéré. La masse molaire moyenne de chaque acide gras est celle de l'ion moléculaire sur la spectrométrie de masse soustraite de la méthylation. Les acides gras sont deutérés sous une distribution de masse de type gaussienne qui peut varier jusqu'à  $\pm 4$  deutérons par acides gras. Le pourcentage de deutération moyen des acides gras est calculé en fonction du nombre de deutérons sur la chaîne acyle, sur le nombre de protons de l'acide gras froid correspondant avec la fonction carboxylique déprotonée. La masse pondérée relative du mélange d'acides gras est calculée à l'aide du pourcentage molaire appliqué à la masse molaire moyenne.

La masse molaire moyenne de la distribution des acides gras partiellement deutérés est de 284 g/mol et le pourcentage de marquage pondéré de la distribution est de 57 %.

En termes d'apport lipidique fourni à la bactérie, le marquage exogène (0,1 mM PA-d<sub>31</sub> et 0,1 mM OA) est effectué à une concentration totale de 0,2 mM qui correspond à 57,0 mg/L d'acides gras pour un ratio d'acides gras saturés/insaturés de 1, soit 50 % (molaire) de C16:0-d et 50 % de C18:1 où seul l'acide palmitique est deutéré. Pour sa part, le marquage endogène est effectué à une concentration de 60 mg/L (57,2 mg/L compensé avec 5 % d'impureté estimée) soit d'environ 0,2 mM afin d'employer des conditions semblables au marquage exogène en termes d'apport lipidique. Le ratio d'acides gras saturés/insaturés est de 0,8, soit 42 % (molaire) saturés et 58 % insaturés. Notons ici que tous les acides gras sont partiellement deutérés à 57 %. Ainsi, aux concentrations d'acides gras utilisées, le nombre de deutérons insérés dans une membrane devrait être seulement un peu plus supérieur pour le marquage endogène et le rapport signal/bruit en RMN-<sup>2</sup>H légèrement amélioré.

### 3.2.2 Comparaison des profils d'acides gras

Le profil d'acides gras des bactéries à la fin de la phase de croissance pour le témoin ainsi que suite aux marquages exogène et endogène sont présentés dans le tableau 3.7 et à la figure 3.12 sous la forme d'histogramme.

Tableau 3.7 Profil d'acides gras en pourcentage relatif molaire pour les marquages exogène et endogène comparés à un témoin à la phase de croissance fin-log

Acides gras	Témoin	Exogène	Endogène
C14:0	4,3 (0,1)	3,2 (0,2)	3,7 (0,1)
C16:0	35,5 (0,7)	39,3 (0,6)	32,7 (0,4)
cyC17:0	27,1 (0,4)	14,2 (0,2)	31,3 (0,2)
C18:0	0,9 (0,1)	0,8 (0,0)	0,9 (0,0)
C18:1	13,1 (0,9)	27,6 (3,1)	15,3 (0,6)
cyC19:0	16,8 (0,6)	14,4 (2,4)	15,5 (0,2)
Autre	2,4 (0,7)	0,5 (0,2)	0,6 (0,0)
Saturés	41,7 (0,6)	43,6 (0,8)	37,9 (0,4)
Insaturés	58,3 (0,6)	56,3 (0,8)	62,1 (0,4)
Ratio Sat/Insat.	0,71 (0,02)	0,78 (0,03)	0,61 (0,01)

Le témoin est calculé sur 4 réplicats et 3 réplicats ont été effectués pour les marquages. Le nombre entre parenthèse est l'écart-type calculé sur les réplicats et représenté dans les barres d'erreurs de la figure suivante. Un exemple de chromatogramme pour le marquage endogène est présenté en annexe B (Chromatogramme B.3).

Le profil d'acides gras du témoin à la fin de la phase de croissance montre que 58 % des acides gras sont insaturés, avec un ratio de lipides saturés/insaturés de 0,7. En ce qui concerne le marquage aux acides gras exogènes (soit PA-d<sub>31</sub> et OA), il y a une perte de 15 % des cyC17:0 et des cyC19:0 en comparaison avec le témoin. Par contre, cette perte est compensée par une augmentation des C18:1 de 15 %. Le ratio de lipides saturés/insaturés augmente à 0,8. L'approche de fournir de l'acide oléique est donc une bonne stratégie pour maintenir une membrane fluide. Enfin pour le marquage endogène, le profil d'acides gras est plus comparable à celui du témoin que pour le marquage exogène. En effet, il y a de faibles variations de l'ordre de 2 % entre les C18:1 et cyC19:0 et de 4 % entre les C16:0 et cyC17:0. Le ratio de lipides saturés/insaturés est de 0,6, près de la valeur de 0,7 du ratio des bactéries témoins.

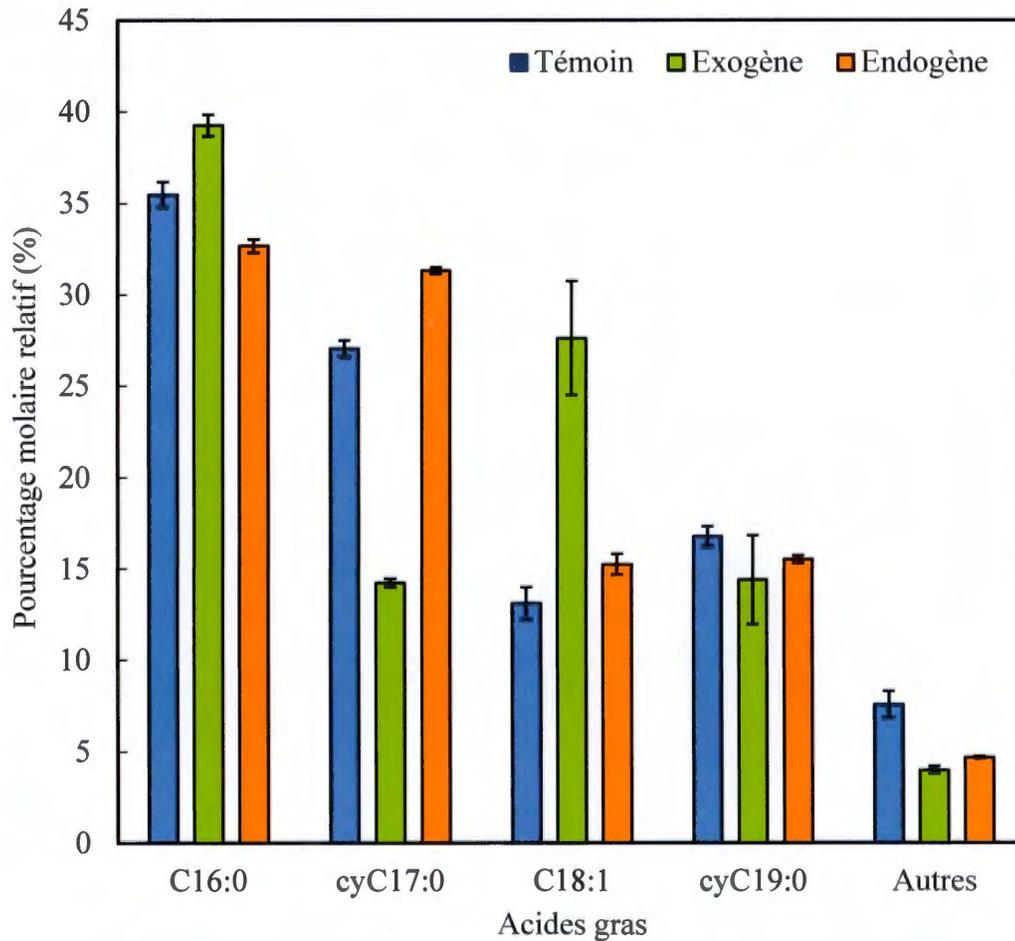


Figure 3.12 Profil d'acides gras pour les marquages exogène et endogène comparés à un témoin, pour des bactéries récoltées à la phase de croissance fin-log.

### 3.2.3 Taux de marquage au $^2\text{H}$

Le taux de marquage est évalué par analyse en GC-MS du profil des acides gras des bactéries marquées. Les taux de marquages exogène et endogène sont respectivement présentés dans les tableaux 3.8 et 3.9 sur le profil d'acides gras et par acide gras deutéré. L'histogramme de la figure 3.13 illustre la proportion d'acides gras deutérés sur le profil d'acides gras pour les marquages exogène et endogène.

Tableau 3.8 Taux de marquage par acide gras du marquage exogène pour trois réplicats

Acides gras	Taux de marquage par acides gras (%)	Pourcentage d'AG totaux	Pourcentage d'AG deutéré
C14:0	71,4 (2,4)	3,2 (0,2)	2,3 (0,2)
C15:0	- -	0,1 (0,0)	- -
C16:0	60,2 (1,8)	39,3 (0,6)	23,7 (1,1)
cyC17:0	- -	14,2 (0,2)	- -
C18:1	- -	27,6 (3,1)	- -
cyC19:0	- -	14,4 (2,4)	- -
Autres	- -	1,2 (0,0)	- -
<b>Somme</b>			<b>26,0 (1,3)</b>

Le taux de marquage par acide gras est calculé à l'aide du pourcentage relatif molaire d'acide gras deutéré sur le pourcentage relatif molaire d'acides gras respectifs froids et deutérés. Le taux de marquage total est obtenu avec la somme des pourcentages relatifs des acides gras deutérés.

Comme nous l'avons observé auparavant, il est intéressant de noter qu'une fraction de l'acide palmitique perdeutééré a subi un cycle de  $\beta$ -oxydation pour former l'acide myristique (C14:0) perdeutééré. La bactérie a donc utilisé l'acide palmitique deutéré comme source d'énergie. Il n'y a pas eu d'autre évidence de modification de l'acide palmitique perdeutééré en d'autres acides gras. Pour le marquage exogène, 26 % des acides gras sont deutérés où 60 % des acides gras saturés sont deutérés, alors qu'aucun acide gras insaturé n'est marqué. Plus de 60 % de l'acide palmitique est deutéré et 70 % de l'acide myristique est également marqué.

Tableau 3.9 Taux de deutération par acide gras du marquage endogène pour trois réplicats

Acides gras	Taux de marquage par acide gras	Pourcentage d'AG totaux	Pourcentage d'AG deutérés
C14:0	78,6 (1,0)	3,7 (0,1)	2,9 (0,1)
C15:0	56,9 (6,4)	0,3 (0,0)	0,2 (0,0)
C16:0	48,8 (1,7)	32,7 (0,4)	16,0 (0,7)
cyC17:0	60,5 (0,7)	31,3 (0,2)	19,0 (0,2)
C18:1	10,4 (0,2)	15,3 (0,6)	1,6 (0,1)
cyC19:0	24,8 (1,0)	15,5 (0,2)	3,9 (0,1)
Autres	- -	1,2 (0,0)	- -
<b>Somme</b>			<b>43,4 (0,8)</b>

Le taux de marquage par acide gras est calculé à l'aide du pourcentage relatif molaire d'acide gras deutéré sur le pourcentage relatif molaire d'acides gras respectifs froids et deutérés. Le taux de marquage total est obtenu avec la somme des pourcentages relatifs des acides gras deutérés.

En ce qui concerne le marquage endogène, 43 % des acides gras sont partiellement deutérés, soit près du double de la valeur obtenue avec le marquage exogène. Il est à noter que ces acides gras sont partiellement deutérés à 57 %, le signal de RMN est donc équivalent. Néanmoins, il pourrait être doublé en utilisant un milieu de culture deutéré à 100% pour la culture de bactéries totalement deutérées. Nous pouvons noter que 50 % des acides gras saturés sont deutérés contre 40 % pour les acides gras insaturés. Comparativement au marquage exogène, le marquage est donc meilleur, et le profil d'acides gras deutérés est aussi mieux distribué dans la membrane sur des acides gras de différentes longueurs de chaînes, d'insaturations et de cyclopropylations. Encore une fois, nous pouvons voir sur la figure 3.13 que le marquage endogène touche tout le profil d'acides gras de la bactérie, alors que le marquage exogène est exclusif à deux acides gras saturés.

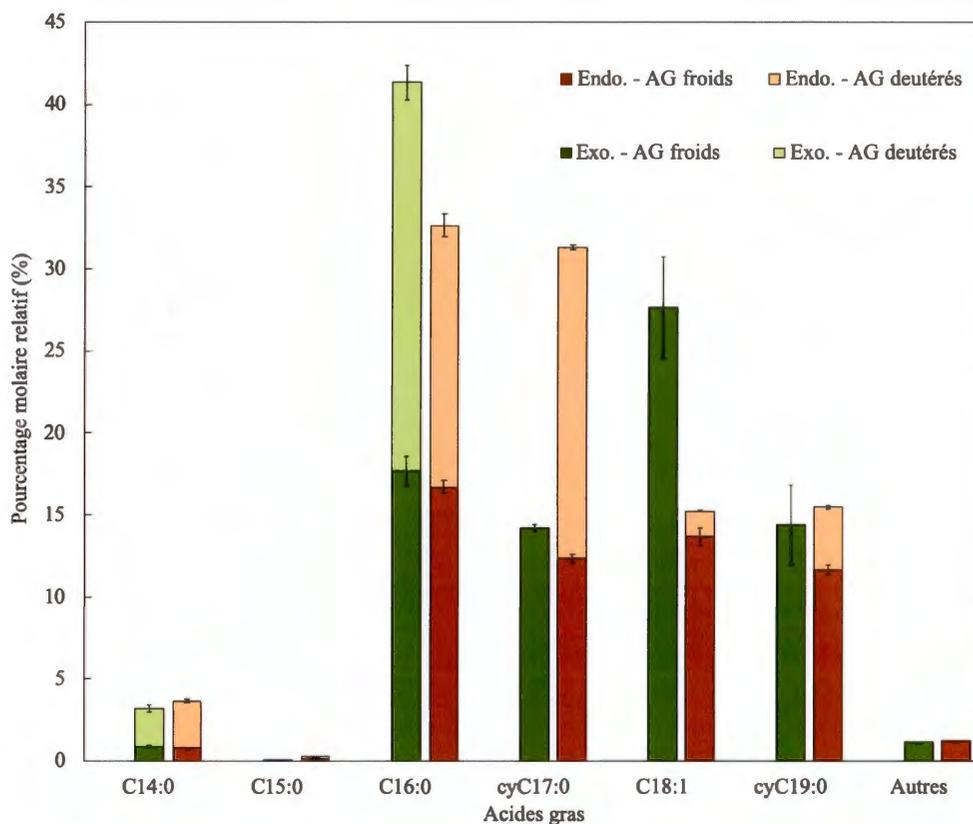


Figure 3.13 Pourcentage relatif molaire d'acides gras froids et deutérés des marquages exogène et endogène.

Les pourcentages relatifs d'acides gras deutérés qui ont été incorporés par *E. coli* à la suite du marquage endogène sont comparés aux mélanges d'acides gras fournis (profil d'acides gras de la bactérie entièrement deutérée) dans le tableau 3.10. Les données sont également représentées dans l'histogramme de la figure 3.14. La figure illustre que la majorité des acides gras incorporés sont similaires au profil d'acides gras deutérés fournis.

Tableau 3.10 Pourcentage relatif molaire des acides gras deutérés incorporés comparé avec le mélange d'acides gras (AG) deutérés fournis

Acides gras	Fournis	Incorporés
C14:0	6,5	6,7 (0,3)
C16:0	36,8	36,7 (1,6)
cyC17:0	35,2	43,7 (0,4)
C18:1	3,4	3,7 (0,1)
cyC19:0	16,1	8,9 (0,3)
Autres	0,9	0,4 -

Le pourcentage des acides gras fournis est le pourcentage relatif molaire des acides gras deutérés produit par la bactérie deutérée (Tableau 3.6). Le pourcentage des acides gras incorporés est calculé à l'aide du pourcentage relatif basé uniquement sur la quantité totale d'acides gras deutérés (43 %) sur trois réplicats, voir Tableau 3.9.

Les C16:0 et les cyC17:0 représentaient 72 % des acides gras fournis à la bactérie. Et 80 % des acides gras deutérés incorporés par la bactérie ont des chaînes à 16 carbones en longueur (C16:0 ou cyC17:0). Les C18:1 et les cyC19:0 représentaient 20 % des acides gras fournis à la bactérie. Par contre, seulement 13 % des acides gras deutérés incorporés sont des chaînes à 18 carbones en longueur (C18:1 ou cyC19:0). Il est donc possible que 7 % des cyC19:0 ont été  $\beta$ -oxydés en cyC17:0. En effet, le mécanisme de  $\beta$ -oxydation enlève deux carbones par cycle et commence par la tête carboxylée de l'acide gras [51]. L'acide cis-11,12-méthylèneoctadécanoïque peut donc se dégrader en acide cis-9,10-méthylènehexadécanoïque en gardant le cyclopropyle à la bonne position par rapport à la chaîne hydrophobe.

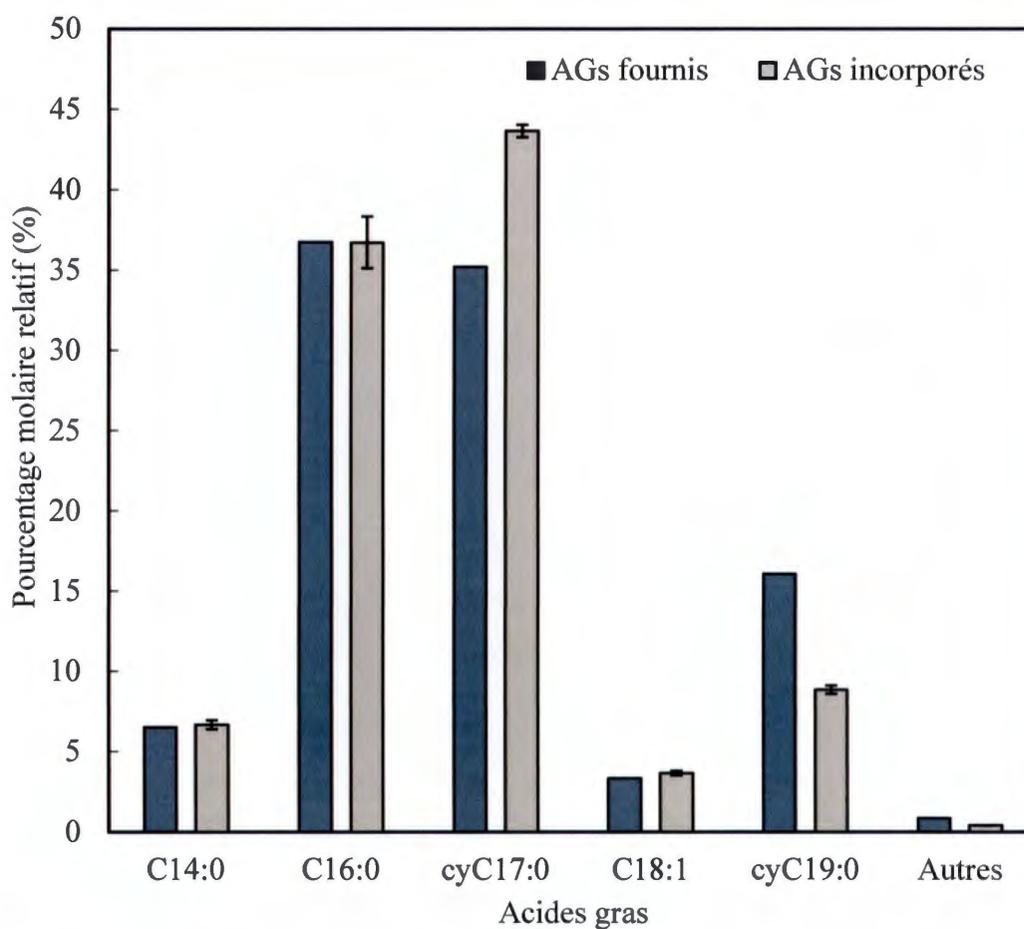


Figure 3.14 Pourcentage relatif des acides gras deutérés incorporés comparé avec le mélange d'acides gras deutérés fournis.

### 3.2.4 Fluidité membranaire

Afin d'évaluer l'impact du marquage isotopique des lipides sur la membrane des bactéries, la fluidité membranaire à la fin de la phase log a été étudiée et est présentée dans cette section. Il s'agit de la comparaison entre les marquages exogène et endogène. Les spectres et leurs  $M_2$  sont présentés à la figure 3.15.

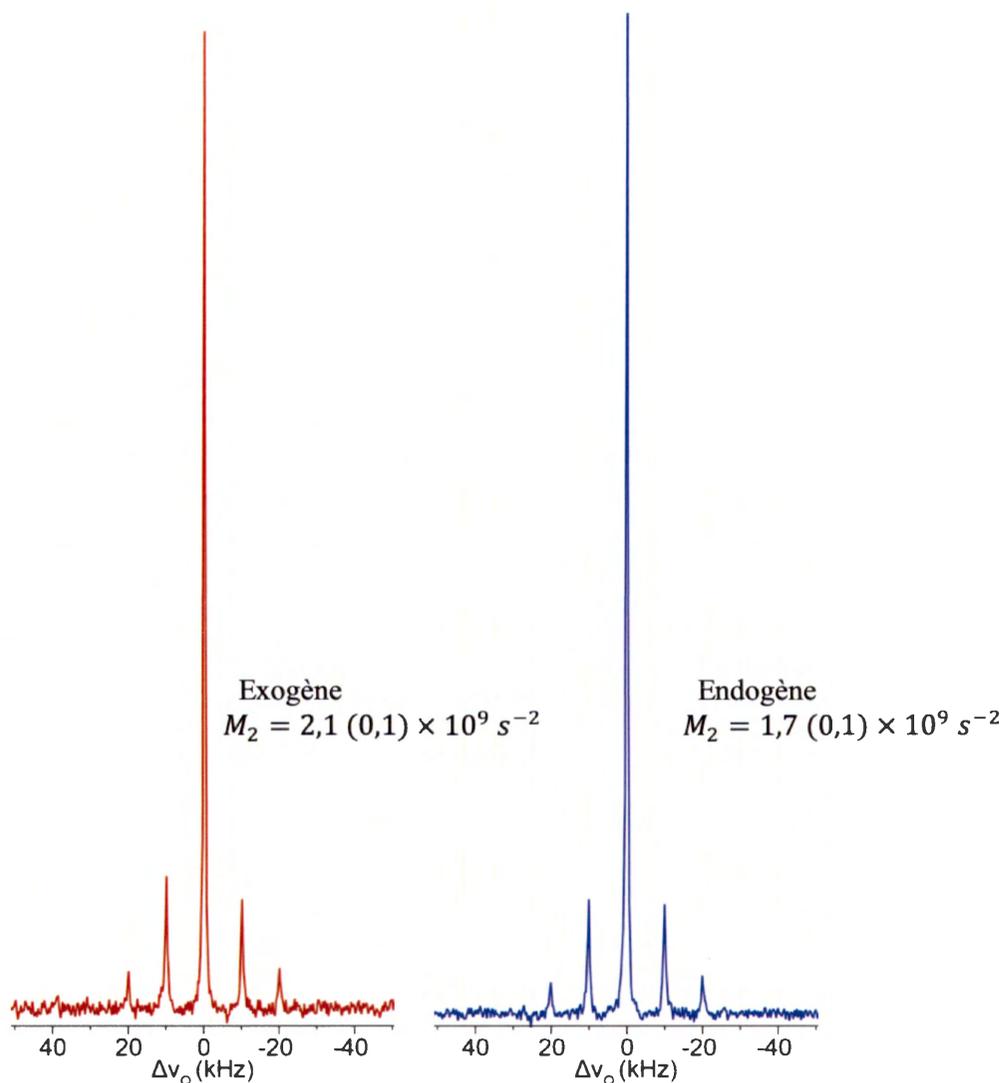


Figure 3.15 Spectre de RMN  $^2\text{H}$  des marquages exogène et endogène d'*E. coli* récoltées à la fin de la phase exponentielle, avec MAS à 10 kHz.

Les acides gras sont solubilisés avec la DPC à 1 mM. Le marquage exogène est effectué à 0,1 mM PA- $d_{31}$  et OA. Le marquage endogène est effectué à 60 mg/L d'acides gras deutérés, semblable à la concentration du marquage exogène. Le temps de croissance est de 5h30 et correspond à une  $DO_{600\text{ nm}}$  de  $2,5 \pm 0,1$ . Les bactéries sont analysées à 37 °C pendant 53 minutes (1024 acquisitions) avec la rotation à l'angle magique à 10 kHz, à la suite d'une période d'équilibration de 15 minutes. Les détails des trois réplicats des spectres analysés sont présentés en annexe B4 et B5 ainsi que sur la figure B.1.

Les spectres présentés sur la figure 3.15 sont similaires ainsi que les réplicats en annexe B.1 avec deux bandes de rotation. Le bruit est également semblable sur tous les réplicats. L'analyse de ces données révèle des valeurs de second moment pour les deux types de marquages qui correspondent à une membrane fluide dans les deux cas. Le second moment obtenu dans le cas du marquage exogène est un peu plus élevé, mais la différence n'est pas très grande. Il est possible que la membrane soit plus rigide, mais il se peut aussi que le second moment provienne d'une membrane tout aussi fluide, mais de chaînes d'acides gras saturés (PA) plus rigides en moyenne que dans le cas du marquage endogène où le second moment provient d'un mélange d'acides gras saturés et insaturés. Dans les deux cas, la valeur obtenue dans le cas du marquage endogène est donc probablement plus proche de ce que serait une fluidité dite native. Il est peu probable que l'estimation de la concentration d'acides gras endogènes ait un impact sur la fluidité membranaire. En effet dans le tableau 3.3, nos résultats indiquent que le second moment est stable pour des concentrations de 0,05 mM à 0,19 mM à la phase de croissance fin-log.

### 3.2.5 Viabilité cellulaire d'*E. coli*

L'effet du marquage des membranes sur la viabilité a été mesuré sur ces trois réplicats à l'aide du test MTT [56]. Le réactif MTT est jaune et soluble en milieu aqueux. Ce réactif est par la suite réduit et devient insoluble et de couleur violacée. La réaction de réduction est liée à la viabilité par l'activité de la déhydrogénase. Les cristaux violets doivent être récupérés de la solution et resolubilisés dans le DMSO. Le taux d'activité de l'enzyme déhydrogénase est donc corrélé à la mesure spectroscopique de la solution violette. La viabilité mesurée sur les trois réplicats des marquages exogène et endogène est présentée dans le tableau B.6 en annexe B. Comme la variabilité de cette manipulation est grande, il serait intéressant d'utiliser une autre méthodologie pour analyser la viabilité des bactéries, par exemple la cytométrie en flux avec un fluorophore approprié.

Le marquage exogène a obtenu une viabilité de 100 (44) %, alors que le marquage endogène a obtenu une viabilité de 97 (13) %. Ce test requiert beaucoup de manipulations et les cristaux peuvent être perdus, comme en témoigne l'écart-type. Néanmoins, il ne semble pas y avoir d'effet sur la viabilité pour les marquages exogène et endogène. À titre de comparaison, la bactérie *E. coli* marquée uniquement avec de l'acide palmitique deutéré a obtenu une viabilité de  $75 \pm 29$  % [19].

### 3.2.6 Synthèse de résultats

Les différences notées entre les marquages exogène et endogène de la bactérie *E. coli* pour le marquage endogène sont résumées dans cette section et le tableau 3.11.

Tableau 3.11 Synthèse des informations relatives aux marquages exogène et endogène des bactéries récoltées en fin-log

Analyse		Témoin	Marquage exogène	Marquage endogène
Acide gras	Ratio Sat./Insat.	0,71 (0,02)	0,78 (0,03)	0,61 (0,01)
	Marquage (%)	- -	26,0 (1,3)	43,4 (0,8)
Second moment $M_2 (10^9 \text{ s}^{-2})$		- -	2,1 (0,1)	1,7 (0,1)
Viabilité (%)		- -	100 (44)	97 (13)

Le marquage exogène est effectué à une concentration de 0,1 mM de PA-d<sub>31</sub> et d'OA. Le marquage endogène est à une concentration semblable (60 mg/L) d'un mélange d'acides gras deutérés à 57 %.

Nos résultats montrent que le ratio de lipides saturés/insaturés est presque respecté pour les marquages exogène et endogène avec un ratio de  $0,7 \pm 0,1$  en accord avec le témoin. Le marquage en acides gras deutérés est de 26 (1) % pour le marquage exogène et de 43 (1) % pour le marquage endogène, soit nettement meilleur. Cette différence peut être expliquée par l'ajout d'acide oléique froid pour le marquage exogène.

Il a été démontré que, pour les deux types de marquages, la bactérie peut  $\beta$ -oxyder une partie des acides gras qui lui sont offerts en adaptant ainsi son profil lipidique. Néanmoins, le profil lipidique de la membrane marquée avec les lipides endogènes est plus près du profil natif de la bactérie. La fluidité membranaire est similaire pour les deux méthodologies de marquage avec une membrane légèrement plus fluide pour le marquage endogène avec un second moment de  $1,7 (0,1) \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  contre  $2,1 (0,1) \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  pour le marquage exogène. Cette différence peut être expliquée par le ratio de lipides saturés/insaturés qui est plus faible, mais aussi par la diversité des acides gras deutérés qui composent la membrane. En ce qui concerne la viabilité, aucun marquage ne semble avoir d'effet néfaste sur la viabilité de la bactérie après les lavages par rapport au témoin.

Le marquage exogène coûte en PA-d<sub>31</sub> 1 \$ par marquage (3,8 mg à 240 \$/g en lot de 5 g). La préparation des lipides endogènes à partir de l'eau lourde à 70 % (365 \$/L) revient à 50 \$ par marquage (7,5 mg qui nécessite 0,14 L). Il est à noter que les prix du marquage endogène peuvent être fortement réduits, car l'eau lourde peut être réutilisée à la suite d'une purification (rota-évaporation et distillation). Les acides gras cyclopropylés et deutérés sont très peu disponibles commercialement, et constituent donc une valeur ajoutée. À titre d'exemple, le cyC17:0 non deutéré coûte 100 \$/mg. Un laboratoire qui envisagerait d'effectuer fréquemment (plus de 100 marquages) des analyses membranaires sur les bactéries gagnerait économiquement à engager un technicien pour effectuer la synthèse des acides gras endogènes. Suite à l'extraction des lipides, les résidus cellulaires riches en protéines et autres macromolécules

pourraient être hydrolysés et incorporés au milieu de culture minimal des lots ultérieurs afin de possiblement augmenter le rendement de production en biofermenteur. En effet, plusieurs milieux de culture bactériens contiennent des hydrolysats de protéines [50]. Augmenter le taux de deutération des bactéries à 100 % est également possible et sans délai d'acclimatation considérable tel que présenté par Tugarinov *et al.* [52].

### 3.3 Comparaison des marquages exogène et endogène de *C. reinhardtii*

Comme pour les bactéries, cette section présente la deutération des membranes de la microalgue au moyen de deux stratégies soient les marquages exogène et endogène. Une troisième source de lipides a été utilisée pour le développement méthodologique, provenant d'une cyanobactérie. Ces résultats sont présentés en annexe D. Les acides gras sont toxiques pour les microalgues [25], donc le marquage employé est passif et utilise des lipides deutérés.

#### 3.3.1 Caractérisation des lipides de marquage

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les lipides utilisés pour le marquage isotopique. Le marquage avec les lipides exogènes a été effectué avec la POPC-d<sub>31</sub> (1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) où seul le palmitate est deutéré et non l'oléate. Ces manipulations ont été effectuées en collaboration avec Alexandre Poulhazan, un autre étudiant du laboratoire, et les résultats (RMN, GC-MS et viabilité) ont été traités par l'auteur. Une concentration de 10 mg/100 mL est utilisée.

Les lipides deutérés et endogènes proviennent de *C. reinhardtii* cultivée dans le D<sub>2</sub>O à 50 % tel que présenté dans la section Matériel et Méthode. Une fois les cellules récoltées, elles ont été lyophilisées. Une concentration en lipide de 12,5 mg/100 mL est utilisée pour compenser la présence de triglycérides. Notre hypothèse est que les lipides polaires sont plus susceptibles d'être incorporés. Un spectre RMN <sup>2</sup>H de l'état solide a été effectué sur la microalgue entièrement deutérée qui contient les lipides deutérés, cependant d'autres composantes sont également deutérées, comme de l'amidon, tel que présenté à la figure 3.16.

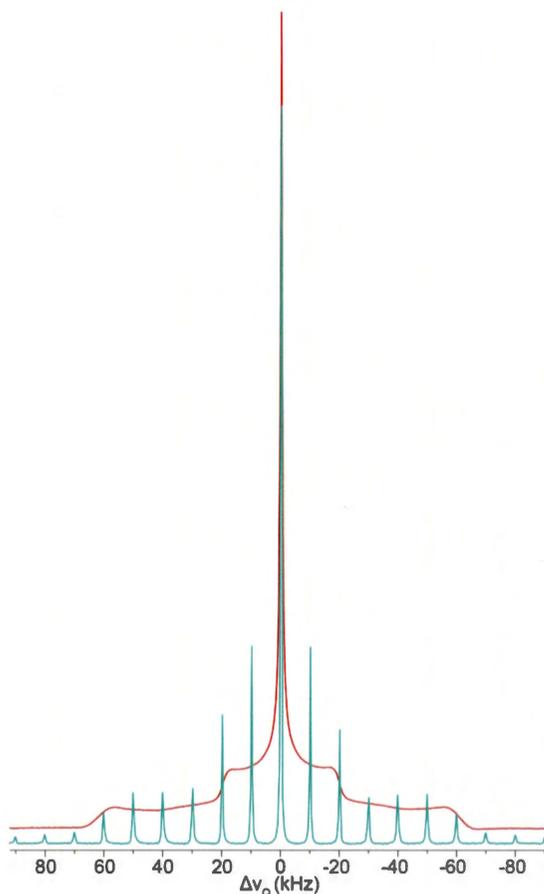


Figure 3.16 Spectre de RMN <sup>2</sup>H de *C. reinhardtii* deutérée à 50 % et lyophilisée. En rouge le spectre statique épouse les bandes de rotation du spectre MAS à 10 kHz en vert à 25 °C.

Ce spectre a une largeur de plus de 200 kHz. Ce grand écart quadripolaire peut être expliqué par la deutération des composantes cristallines (amidon, protéines et paroi cellulaire) que nous pouvons retrouver à l'intérieur de cette microalgue, mais aussi parce que l'échantillon est lyophilisé, et que les mouvements moléculaires sont ainsi réduits.

Par la suite, les lipides ont été extraits comme décrit dans le chapitre II. Les lipides ont été utilisés en entier; ils ne sont pas saponifiés. Ce mélange de lipides n'est pas très bien caractérisé compte tenu de la complexité des têtes polaires sucrées, et avec un grand nombre d'isomères d'acides gras (C18:1,2,3). Néanmoins, une analyse par GC-MS a permis de connaître le taux de deutération majoritaire de ces acides gras tel que présenté dans le tableau 3.12 et à la figure 3.17.

Tableau 3.12 Pourcentage relatif molaire des principaux acides gras retrouvés dans *C. reinhardtii* pour un témoin et la microalgue deutérée

Acide gras	Témoins	Microalgue deutérée	
	% relatif	% relatif	% Deutération
C16:0	35,7 (0,4)	35,6 (1,0)	49
C18:0	3,1 (0,3)	2,6 (0,8)	50
C18:1,2,3	61,1 (0,4)	61,8 (1,7)	48

D'autres acides gras sont détectés sur le spectre GC-MS (16:2,4), en faible proportion, ainsi que possiblement des groupements phytyles de la chlorophylle. Ces derniers composants ont été exclus du pourcentage relatif molaire. Pour le témoin, trois réplicats ont été effectués et deux réplicats pour les microalgues deutérées. Le pourcentage de deutération est calculé avec la masse via la spectrométrie de masse et en fonction du nombre de deutérons maximal qui peut s'insérer sur l'acide gras donné.

Tel que présenté dans la figure 3.17, la deutération de la microalgue dans le milieu de culture de D<sub>2</sub>O à 50 % ne semble pas avoir altéré son profil d'acides gras. La deutération par acides gras est en moyenne de 49 %, soit quasiment le maximum de la valeur espérée comme les deutérons proviennent de l'eau deutérée à 50 %. Il est à noter que les acides gras sont deutérés en distribution gaussienne qui varie jusqu'à 4

deutérons par acides gras. Rappelons donc que le taux de deutération pourrait être doublé en cas de nécessité.

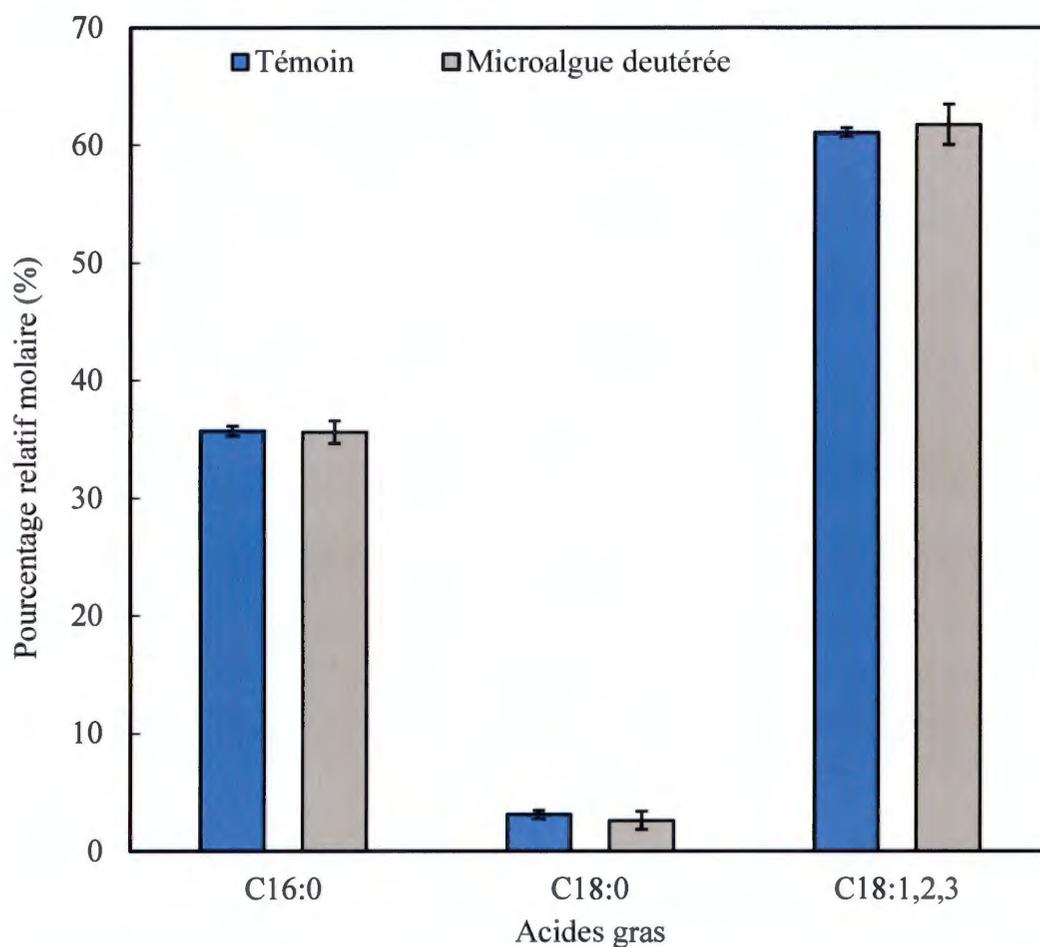


Figure 3.17 Pourcentage relatif des principaux acides gras retrouvé dans *C. reinhardtii* pour un témoin et la microalgue deutérée.

### 3.3.2 Profil d'acides gras (comparaison exogène et endogène)

Le marquage lipidique de la microalgue a été effectué avec les deux sources de lipides, soit exogènes commerciaux (POPC- $d_{31}$ ) soit le mélange de lipides endogènes. Le profil d'acides gras à la suite des marquages exogène et endogène est présenté dans le tableau 3.13 et illustré sous forme d'histogramme à la figure 3.18. Il y a une augmentation de

5 % d'acides gras saturés pour le marquage exogène. Cette augmentation est significative par rapport aux témoins, mais aurait besoin d'autres réplicats. Le marquage endogène n'altère pas le profil d'acides gras.

Tableau 3.13 Profil d'acides gras en pourcentage relatif molaire pour les marquages exogène et endogène de *C. reinhardtii*, comparé à un témoin

Acide gras	Témoin % relatif	Exogène % relatif	Endogène % relatif
C16:0	35,7 (0,4)	41,4	34,4 (1,0)
C18:0	3,1 (0,3)	2,3	3,4 (0,6)
C18:1,2,3	61,1 (0,4)	56,3	62,2 (0,5)

Le témoin et le marquage endogène ont été effectués en 3 réplicats et le marquage exogène a été effectué une seule fois. Le nombre entre parenthèse est l'écart-type calculé sur les réplicats et représenté dans les barres d'erreurs de la figure suivante. Un exemple de chromatogramme pour le marquage endogène est présenté en annexe B (Chromatogramme B.4).

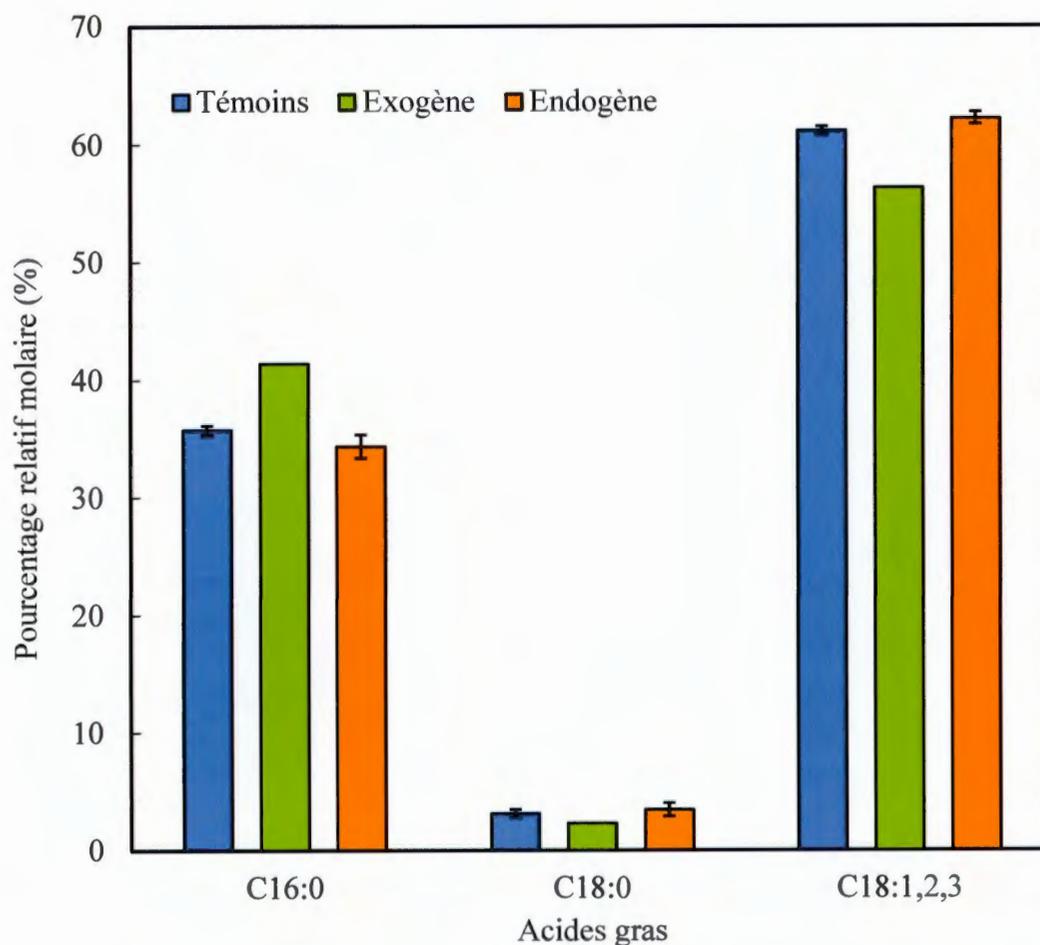


Figure 3.18 Profil d'acides gras pour les marquages exogène et endogène de *C. reinhardtii*, comparé à un témoin.

La POPC-d<sub>31</sub> (C16:0-d<sub>31</sub>; C18:1) du marquage exogène est également une source d'acide oléique et seul l'acide palmitique qui est supérieur au témoin. La microalgue a possiblement ralenti la synthèse de cet acide gras sous l'effet de l'ajout de POPC, ce qui suggère que la diffusion des lipides du milieu extérieur vers la microalgue n'est peut-être pas simplement passive. Encore une fois, le marquage endogène n'altère pas significativement le profil d'acides gras. Cependant, 60 % des microalgues semblent mortes sous l'effet du marquage exogène tel que présenté dans la section (3.3.4).

Les deux tableaux suivants (3.14 et 3.15) présentent le taux de marquage en deutérium par rapport au profil d'acides gras pour les marquages exogène et endogène, respectivement. Rappelons ici que la POPC-d<sub>31</sub> pour le marquage exogène est seulement deutérée sur le palmitate. Le taux de marquage du marquage endogène est une estimation basée sur les acides gras saturés.

Tableau 3.14 Taux de marquage des lipides de *C. reinhardtii* au deutérium via les lipides exogènes deutérés à 100 %

Acide gras	Taux de marquage par acide gras (%)	% relatif molaire d'acides gras total	% relatif molaire d'acides gras deutérés
C16 :0	50,8	41,4	19,9
C18 :0	-	2,3	-
C18 :1,2,3	-	56,3	-
Somme			19,9

Le marquage a été effectué une seule fois.

Tableau 3.15 Taux de marquage des lipides de *C. reinhardtii* en deutérium via les lipides endogènes deutérés à 50 %

Acide gras	Taux de marquage par acides gras (%)	% relatif molaire d'acides gras total	% relatif d'acides gras deutéré
C16:0	14,8 (4,3)	34,4 (1,0)	4,8 (1,3)
C18:0	9,5 (8,3)	3,4 (0,6)	0,6 (0,0)
C18:1,2,3	14,4 (4,3)	62,2 (0,5)	8,9
Somme			14,3

Le marquage a été effectué en trois répliquats. L'écart-type des C18:0 deutérés est basé sur deux répliquats, car le bruit était trop important pour un des répliquats. Le taux de marquage pour les C18:1,2,3 est une estimation basée sur l'incorporation des acides gras saturés, car les C18 froids insaturés ne sont pas résolus, il en va de même pour les deutérés. Le taux de marquage est donc une estimation. Le nombre entre parenthèse est l'écart-type calculé sur les répliquats et représenté dans les barres d'erreurs de la figure suivante. Un exemple de chromatogramme pour le marquage endogène est présenté en annexe B (Chromatogramme B.4).

Lors du marquage exogène, la POPC deutérée s'est très bien incorporée dans la microalgue, malgré une tête polaire qui n'est pas naturelle pour *C. reinhardtii*. Le taux d'incorporation de l'acide palmitique deutérée exogène est de 51 % pour un taux de marquage de 20 % des lipides de *C. reinhardtii*. Pour le marquage endogène, le pourcentage d'incorporation est estimé à 14 % qui est effectué avec les lipides partiellement deutérés à 50 %. Avec des lipides endogènes totalement deutérés, le signal pourrait doubler, mais dans ces conditions l'incorporation en acides gras deutérés resterait de 14 %.

L'incorporation d'apparence plus faible des lipides endogènes peut être expliquée par la composition du mélange lipidique qui contient plusieurs constituants comme des pigments ou des triglycérides. Ce mélange est donc moins concentré en lipides polaires que le produit commercial utilisé pour le marquage exogène. Des concentrations supérieures de lipides pourraient être testées ou l'utilisation de la fraction polaire de lipide. La tête polaire choline de la POPC est zwitterionique et pourrait donc paradoxalement aider à s'incorporer dans la membrane des microalgues qui est surtout chargée négativement. Tel que présenté dans le tableau 1.4, 22 % des lipides de la membrane sont chargés négativement et 15 % sont zwitterioniques, le reste étant neutre.

### 3.3.3 Fluidité membranaire

L'effet du marquage au  $^2\text{H}$  des lipides sur la fluidité de la membrane des microalgues marquées a été analysé par la RMN du  $^2\text{H}$ . Les spectres, présentés à la figure 3.19 avec leurs  $M_2$ , montrent que le signal de la bande centrale est plus intense suite au marquage endogène : les bandes de rotation sont donc de plus faible intensité. Le signal est également plus faible lorsque comparé avec le nombre d'acquisitions qui est 12 fois plus grand pour le marquage endogène. Rappelons que le marquage exogène est de 20 % où 100 % de l'acide gras est deutéré, alors que le marquage endogène est de 14 % où 50 % des acides gras sont deutérés.

La bande centrale pour le marquage endogène est beaucoup plus grande que pour le marquage exogène. Ce qui réduit la valeur du second moment, puisque le signal de lipides ayant des mouvements rapides y est retrouvé. Notons aussi qu'à l'heure actuelle, rien ne permet d'affirmer si une valeur de  $M_2$  proche de  $2 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  ou de  $0,9 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  est plus près de ce que serait la valeur dite native d'une membrane de *C. reinhardtii*. En effet, une valeur de  $2 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  pourrait être trop élevée, et indiquer la présence de microalgues mortes. D'autres expériences sont nécessaires pour trancher ce point, et en particulier des études de viabilité comme détaillées dans la partie suivante.

Afin de mieux interpréter les résultats de  $M_2$ , une image par microscopie de fluorescence de *C. reinhardtii* est étudiée. Le marquage est effectué à l'aide d'un lipide avec une tête polaire de phosphatidylcholine et ayant un fluorophore nitrobenzoxadiazole (NBD) sur une chaîne acyle dans des conditions similaires à celles effectuées dans nos expériences. Comme nous pouvons le constater sur la figure 3.20, la membrane plasmique est marquée, ainsi que celles des organelles. Il est à noter qu'il y a aussi des points très intenses qui semblent être des gouttelettes lipidiques.

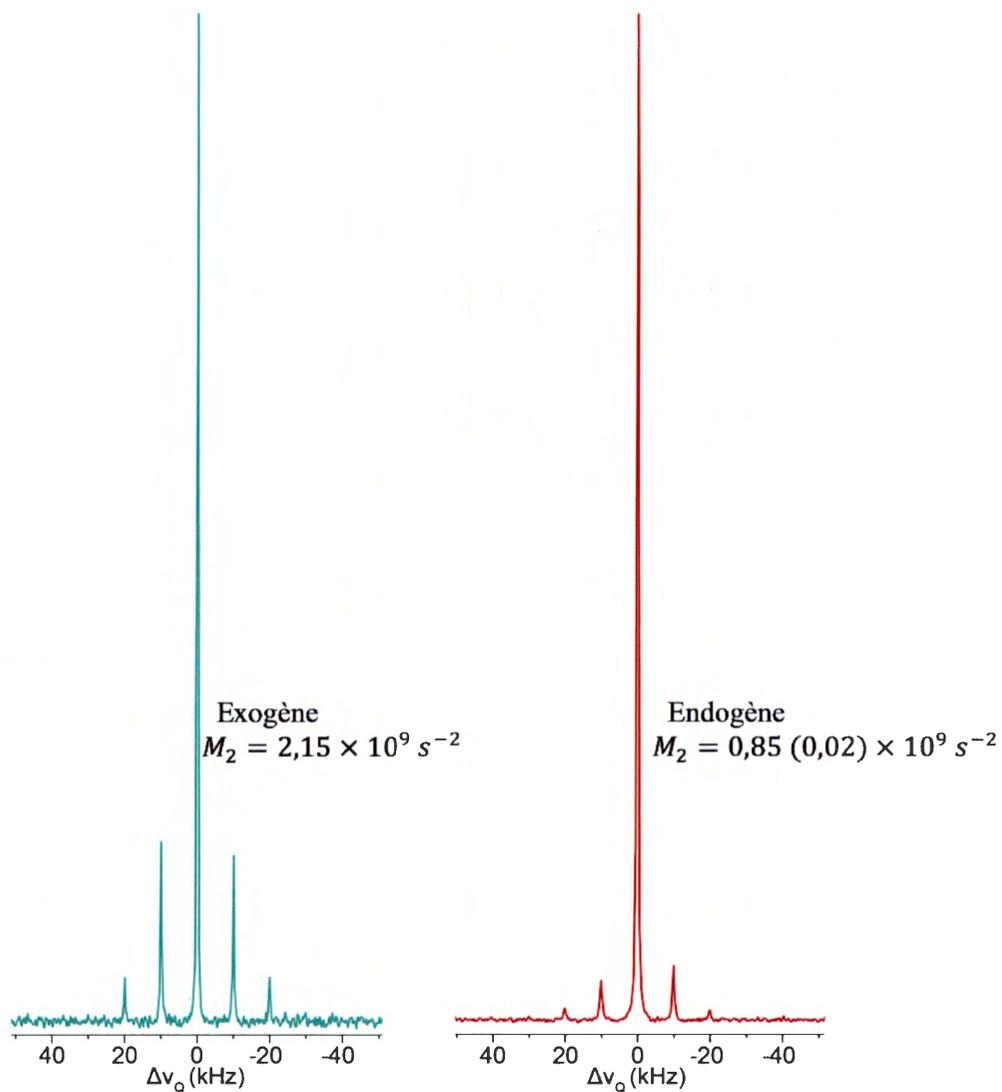


Figure 3.19 Spectre de RMN  $^2\text{H}$  de *C. reinhardtii* marquée avec les lipides exogènes à gauche (1024 acquisitions) et endogènes à droite (12 288 acquisitions) tous deux à 25 °C, avec MAS à 10 kHz.

Les répliqués du marquage endogène comparé au marquage exogène sont disponibles en annexe B à la figure B.2. Les seconds moments des répliqués sont disponibles dans le tableau B.7.

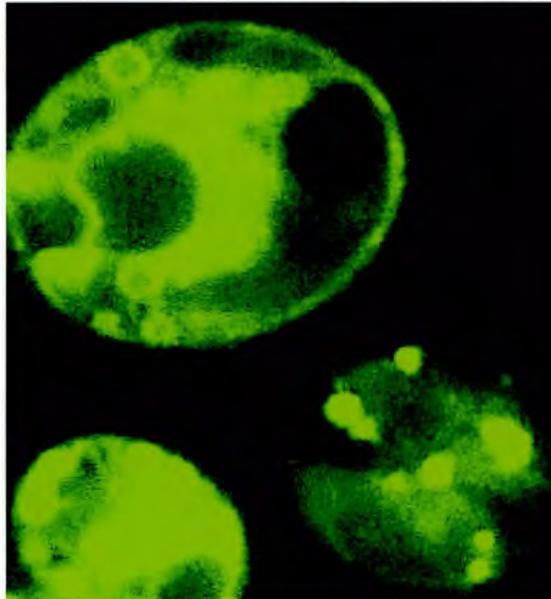


Figure 3.20 Microscopie par fluorescence de *C. reinhardtii* avec un phosphocholine-NBD.

Résultat non publié effectué à l'IBPC (Paris) par Dror E. Warschawski, Francesca Zito et Arnaud Gautier. Le lipide a été incorporé avec une méthodologie semblable à Garnier *et al.* [58].

Le marquage endogène présente un faible  $M_2$  comparativement au marquage exogène. Cette différence peut être expliquée par la présence de lipides insaturés comme sonde de marquage ou par le fait que les lipides utilisés contiennent des triglycérides, et que ces derniers pourraient être conservés sous la forme de gouttelettes lipidiques dans la microalgue. Ces objets sont susceptibles d'avoir un plus petit  $M_2$  en raison de leurs mouvements moléculaires plus rapides qui est dû à un système avec moins de contraintes qu'une membrane. Par contre sur la figure 3.20, nous pouvons voir des gouttelettes lipidiques même avec un marquage employant uniquement des phospholipides. Comme expliqué par Wang *et al.* [71], la microalgue peut produire des gouttelettes lipidiques lorsqu'elle est stressée, par exemple par une déplétion en azote. Elles accumulent les lipides comme réservoir énergétique.

Il est également important de souligner que lors du marquage exogène pour les bactéries et les microalgues où les phospholipides sont marqués avec des chaînes acyles deutérées, un  $M_2$  de  $2 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  est obtenu. Cette valeur est caractéristique d'une membrane fluide. Et lors du marquage avec les lipides endogènes ou exogènes naturels (annexe D), des microalgues où les chaînes acyles sont partiellement deutérées ainsi que les têtes polaires, un  $M_2$  de  $0,9 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  est obtenu. Il est possible que les deutérons sur les têtes polaires aient des mouvements rapides qui viennent alors réduire le  $M_2$  en contribuant à la bande centrale. Bien que les sucres sur la tête polaire soient cycliques, ils peuvent tourner sur eux même. La littérature sur les glycolipides deutérés est limitée, mais Seelig *et al.* [72] confirment par RMN  $^2\text{H}$  et d'autres techniques que la tête choline des phospholipides tourne rapidement et change de conformation énantiomérique au-delà de la température de transition.

#### 3.3.4 Viabilité (analyse de cytométrie en flux)

Afin d'analyser l'impact du marquage exogène ou endogène sur la santé des microalgues, une analyse par cytométrie a été effectuée. Cette analyse utilise un témoin (sans marquage) afin de connaître le taux de mortalité normal de la population de microalgues. L'autofluorescence de la chlorophylle est utilisée comme marqueur ainsi que l'activité métabolique de l'estérase qui hydrolyse le diacétate de fluorescéine (FDA).

L'autofluorescence de la chlorophylle est présentée à la figure B.3 en annexe, les nuages de points de deux populations étudiées (faible et saine) et de leurs histogrammes de l'intensité de la chlorophylle sont présentés pour les marquages exogène, endogène et leurs témoins respectifs. Les valeurs sont présentées dans le tableau 3.16.

Tableau 3.16 Pourcentage des populations (Pop.) dans les régions sélectionnées et intensité (Int.) de chlorophylle (Chl.) (unité relative) pour le marquage exogène et endogène

		Pop. faible (P1)		Pop. saine (P2)	
		% Total	Int. Chl. (10 <sup>3</sup> )	% Total	Int. Chl. (10 <sup>3</sup> )
Exogène (POPC)	Témoin	3	14	97	1300
	Marquage	65	4	36	1000
Endogène	Témoin	9 (2)	73 (12)	90 (2)	1900 (200)
	Marquage	8 (1)	94 (88)	92 (0)	1600 (300)

Le marquage exogène a été effectué une seule fois. L'écart-type de trois réplicats est représenté entre parenthèses pour le marquage endogène.

En ce qui concerne le marquage exogène comparé à son témoin, il y a une forte augmentation en terme de pourcentage (20 fois plus) de la population faible (P1). La granulosité semble toujours proportionnelle à la taille, ce qui illustre une distribution de taille de cellules. Une intensité trois fois plus faible du témoin est enregistrée dans l'histogramme de la chlorophylle. Cette intensité nous confirme que les objets analysés ne sont pas des débris, car ils contiennent de la chlorophylle. Il y a donc nettement plus de petites cellules dans la population faible avec une plus faible concentration de chlorophylle. La population saine (P2) comporte le tiers des cellules marquées à la POPC et conserve une intensité de la chlorophylle semblable au témoin. Pour le marquage endogène et son témoin, il n'y a pas de différence significative entre les populations faible et saine. En résumé, la viabilité peut être estimée par rapport à la chlorophylle à 94 % pour le groupe témoin, 36 % pour le marquage exogène et 92 %

pour le marquage endogène. En conséquence, le marquage à la POPC-d<sub>31</sub> affecte la viabilité de *C. reinhardtii* par rapport à l'autofluorescence de la chlorophylle.

L'activité métabolique via le FDA est présentée à la figure B.4 en annexe. Une sélection de la population par région a été effectuée afin de mettre en évidence l'activité métabolique traduite par l'hydrolyse du FDA. La région R7 sélectionne les cellules les plus saines de par leurs tailles homogènes ainsi que par leurs fortes intensités de chlorophylle. La région R8 prend en considération les plus petites cellules ayant une plus faible intensité de chlorophylle tout en excluant les débris. Les valeurs numériques de la figure sont présentées dans le tableau 3.17.

Tableau 3.17 Pourcentage des populations (Pop.) dans les régions sélectionnées et intensités (Int.) du FDA (unité relative) pour le marquage exogène et endogène

		Pop. faible (R8)		Pop. saine (R7)	
		% Total	Int. FDA (10 <sup>3</sup> )	% Total	Int. FDA (10 <sup>3</sup> )
Exogène (POPC)	Témoin	2	11	97	42
	Marquage	44	1,9	31	58
Endogène	Témoin	7 (2)	19 (10)	91 (2)	1100
	Marquage	7 (1)	10 (6)	92 (1)	150 (60)

Le marquage exogène a été effectué une seule fois. L'écart-type de trois répliquats est représenté entre parenthèses pour le marquage endogène.

La population faible (R8) comporte les plus petites cellules avec moins d'intensité en chlorophylle. Comme pour P1, il y a donc encore une fois, 20 fois plus de cellules du marquage exogène dans cette région. Les cellules dans cette région sont moins actives métaboliquement. L'intensité du FDA est très forte pour le témoin et le marquage endogène qui peut être expliqué par une période d'incubation plus longue avec le FDA ou avec l'omission d'utilisation d'un filtre atténuateur. La population saine du marquage exogène comporte également le tiers du témoin avec une activité métabolique légèrement plus forte. En résumé, par rapport à l'hydrolyse de FDA, la

viabilité cellulaire peut être estimée à 94 % pour le témoin, 31 % pour le marquage exogène et à 91 % pour le marquage endogène. Le marquage à la POPC-d<sub>31</sub> affecte donc la viabilité de *C. reinhardtii* par rapport à l'hydrolyse du FDA.

Pour résumer les résultats des tests de viabilité cellulaire, les cellules exposées aux lipides exogènes semblent altérées, car 70 % des cellules sont plus petites et ont moins de chlorophylle. Ces dernières ont également une activité métabolique d'hydrolyse plus faible du FDA. Ces différences ne sont pas observées pour le marquage endogène. Les plus petits individus analysés ne sont pas des débris ou bien des liposomes, car ils ont une fluorescence (de plus faible intensité) à la fluorescéine et à la chlorophylle. La viabilité par rapport à la chlorophylle et au FDA peut être estimée à 94 % pour le témoin, à 34 % pour le marquage exogène et à 92 % pour le marquage endogène. Il faut donc effectuer d'autres réplicats sur le marquage exogène. Et il faut aussi se questionner sur la valeur de second moment obtenue et analyser les cellules faibles par microscopie pour mesurer leur tailles et leurs allures générales avec une coloration au bleu d'*Evans* pour analyser la mort cellulaire sous un autre angle [73].

### 3.3.5 Synthèse des résultats

Le tableau 3.21 présente une synthèse des résultats principaux de la section 3.3 pour le marquage exogène et endogène de la membrane de *C. reinhardtii*.

Tableau 3.18 Synthèse des données pour les marquages exogène et endogène de *C. reinhardtii* comparé à un témoin

Analyse		Témoin	Marquage exogène		Marquage endogène
Acides gras	Insaturés (%)	61,1 (0,4)	56,3	-	62,2 (0,5)
	Marquage (%)	- -	19,9	-	14,3 -
Second moment $M_2$ ( $10^9$ s <sup>-2</sup> )		- -	2,15	-	0,853 (0,018)
Viabilité (%)	Chl.	90 (2)	36	-	92 (0)
	FDA	91 (2)	31	-	92 (1)

Le marquage exogène au moyen de la POPC offre un marquage 5 % supérieur à celui du marquage endogène (14 %), par contre il augmente légèrement la proportion d'acides gras saturés également de 5 %. Le second moment du marquage exogène est considérablement plus élevé que celui du marquage endogène. Cette différence peut être expliquée par le taux élevé d'acides gras polyinsaturés retrouvés dans les lipides endogènes et que leurs têtes polaires sont deutérées, ces mouvements supplémentaires sondés peuvent contribuer à abaisser le  $M_2$ . Néanmoins, comme nous l'avons déjà mentionné, il est possible que les lipides soient conservés sous la forme de gouttelettes lipidiques au sein de la microalgue. Les lipides à l'intérieur de ces constituants sont susceptibles d'avoir des mouvements moléculaires plus rapides et donc d'avoir un plus faible  $M_2$ .

Il serait judicieux d'extraire ces gouttelettes et de quantifier leur taux de deutération. Par contre le défi repose sur une méthodologie adaptée pour extraire ces gouttelettes sans qu'il y ait de contamination avec les lipides du chloroplaste ou de la membrane plasmique. Comme expliqué par Wang *et al.* [71], la membrane plasmique de *C. reinhardtii* sans paroi peut être déstabilisée par la digitonine et être lysée suite à un

choc osmotique. Les gouttelettes lipidiques peuvent ensuite être récupérées par ultracentrifugation. Les gouttelettes isolées ainsi peuvent contenir 0,04 à 0,07 % de la chlorophylle de toute la cellule. Les auteurs ne précisent pas s'il est normal d'y retrouver de la chlorophylle, mais y retrouvent des contaminations ribosomales sans y détecter de contamination de la membrane plasmique. La chlorophylle peut provenir d'une contamination de la membrane chloroplasmique (qui est la plus volumineuse).

Afin de visualiser si la tête polaire du lipide utilisée a une incidence sur la formation de gouttelettes lipidiques, une seconde approche serait d'utiliser un fluorophore hydrophobe et de le coupler sur un triglycéride avec les mêmes chaînes acyles que les lipides endogènes ou bien sur un lipide polaire avec une tête polaire glycosylée (MGDG et DGDG) pour suivre son cheminement dans la cellule par microscopie. Le fluorophore *BODIPY*® de *ThermoFisher* comme acide gras est non polaire et peut avoir une fluorescence à 510 nm qui est en dehors de celle de la chlorophylle. Ce fluorophore à l'avantage d'être moins polaire que le nitrobenzoxadiazole (NBD) et pourrait donc mieux se comporter comme un acide gras naturel. L'acide cis-parinarique est un acide gras à 18 carbones fluorescents avec 4 insaturations conjuguées. Il serait un parfait candidat, mais il émet dans le spectre de chlorophylle. Velmurugan *et al.* [74] utilisent le *BODIPY*® sous forme d'acides gras pour étudier les gouttelettes lipidiques dans *C. reinhardtii* par cytométrie en flux.

En ce qui concerne la viabilité, un seul réplicat a été effectué pour le marquage exogène. Les résultats au moyen de la chlorophylle et du FDA indiquent qu'une cellule sur trois est viable, alors que pour le marquage endogène, il n'y a pas de différence avec le témoin : les cellules sont saines. Cette différence pourrait être causée par le groupement choline de la POPC qui est naturellement retrouvé seulement à l'état de traces dans la microalgue. D'autres réplicats exogènes doivent donc être effectués pour confirmer ces données.

Selon nos résultats, le marquage endogène serait une meilleure avenue que le marquage exogène pour l'étude des membranes de la microalgue par RMN  $^2\text{H}$  *in vivo*. Par contre, il faudrait mieux analyser la potentielle présence de gouttelettes lipidiques qui pourrait interférer avec nos analyses des membranes de *C. reinhardtii* et la quantité de ces gouttelettes en fonction du type de lipide introduit. En effet, il ne faut pas oublier que le  $M_2$  mesuré est la moyenne de l'ensemble des  $M_2$  des lipides marqués, ceux de la membrane et ceux des gouttelettes.

Un marquage exogène à la POPC- $d_{31}$  (10 mg) coûte 85 \$ et ce lipide n'a pas une tête polaire retrouvée chez *C. reinhardtii*. Le MGDG est un lipide retrouvé chez la microalgue. Une fois purifié il coûte 300 \$ pour 10 mg de lipide non deutéré. Un tel lipide deutéré coûterait donc encore plus cher et il est difficile de trouver un fournisseur.

Le marquage avec des lipides endogènes deutérés à 50 % (12,5 mg) coûte 65 \$ et est obtenu au moyen de 180 mL d'eau lourde deutérée à 70 % (365 \$/L). Cette eau lourde peut aussi être récupérée, faisant descendre les coûts de synthèse. Ce mélange lipidique pourrait augmenter sa valorisation sur le marché s'il était purifié en lipides polaires isolés (MGDG, DGDG et SQDG) sans pigments. La séparation des lipides à têtes sucrées est tout de même un défi de taille, mais envisageable. Néanmoins, il est plus économique d'effectuer un marquage avec le mélange de lipides endogènes à 50 % qu'avec les lipides commerciaux. Augmenter le taux deutération de la microalgue eucaryote est un autre défi de taille qui rajouterait à la valorisation des lipides. Le processus d'acclimatation est long pour cette souche. Néanmoins, il est possible d'acheter une souche acclimatée à l'eau lourde à 95 % pour moins de 2000 \$ canadiens.



## CONCLUSION

L'objectif de ce projet était d'effectuer un marquage de membranes biologiques au moyen de lipides endogènes sur deux microorganismes, soit la bactérie *E. coli* et la microalgue *C. reinhardtii*, approche que nous appelons « marquage cannibale » ou endogène. Pour ce faire, le premier objectif était d'optimiser les conditions de marquages idéales avec l'utilisation de lipides exogènes sur *E. coli* ou exogènes naturels pour *C. reinhardtii*. Par la suite, les microorganismes ont été cultivés dans l'eau lourde partiellement deutérée pour marquer les organismes en entier et ensuite en extraire leurs lipides. Finalement, les microorganismes ont été marqués avec les lipides endogènes. Le marquage ainsi que le profil d'acides gras ont été évalués par GC-MS, et la fluidité membranaire par la RMN  $^2\text{H}$  de l'état solide avec rotation à l'angle magique et analyse du second moment spectral. La viabilité des microorganismes a également été analysée. Enfin, les deux types de marquage, exogène et endogène, ont été comparés.

### Bactérie

Le premier objectif pour le marquage d'*E. coli* était de trouver les conditions de marquage optimales pour le marquage exogène de la membrane d'*E. coli* de cellules fraîches. Pour ce faire, les bactéries ont été récoltées à différentes phases de croissance, et différentes concentrations d'acides gras ont été étudiées. Le taux de marquage en PA-d<sub>31</sub> tend à plafonner pour les concentrations supérieures à 0,10 mM en PA-d<sub>31</sub> et OA pour les deux phases de croissance. Il est de 27 % pour la culture récoltée à la phase mi-log et de 22 % pour la culture récoltée à fin-log. Pour les concentrations de 0,10

mM et 0,19 mM, le ratio de lipides saturés/insaturés est de 0,8 à 1,1 pour les bactéries récoltées à la phase de croissance mi-log, alors qu'il est de 0,7 à 0,8 à la phase fin-log. La membrane est plus riche en lipides insaturés (cyclopropylés) à la fin de la phase log. Pour la concentration de 0,19 mM à mi-log, il y a parfois plus d'acides gras saturés que d'insaturés. Pour les six conditions de marquage (concentrations et phases de croissance), le second moment est d'environ de  $2 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ , sauf pour la concentration de 0,19 mM à la phase mi-log qui peut parfois avoir un  $M_2$  de plus de  $10 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ . Il a été démontré que le profil d'acides gras ainsi que la mesure du second moment affichent une plus faible variabilité pour la phase de croissance à la fin de la phase logarithmique pour les concentrations inférieures à 0,19 mM. Les conditions de marquages idéales pour le marquage d'*E. coli* sont donc avec une concentration de 0,10 mM de PA-d<sub>31</sub> et OA sur des cellules récoltées à la fin de la phase logarithmique. Depuis 1979, les marquages précédents ont été effectués avec de l'acide palmitique deutéré à une concentration allant de 0,17 mM à 0,19 mM [15, 17-19], notre optimisation indique qu'une concentration 0,1 mM est suffisante. Il est à noter que les marquages sont effectués sur une souche sauvage d'*E. coli* qui a donc la possibilité de métaboliser ses acides gras. En effet, sur la culture récoltée à la fin de la phase logarithmique, de l'acide myristique deutéré (à 14 carbones) est détecté. L'acide palmitique deutéré (à 16 carbones) a donc été métabolisé par la bactérie tout en ajustant son profil d'acides gras. L'utilisation d'une souche sauvage rend l'application de la méthodologie plus simple pour d'autres laboratoires.

Le second objectif pour les bactéries était de produire des lipides endogènes dans le but d'effectuer ultérieurement un marquage avec ces lipides. La bactérie a donc été entièrement deutérée en la cultivant dans un milieu minimal et optimal avec de l'eau deutérée à 70 % et un sucre froid. Les lipides ont été extraits de la bactérie ainsi que saponifiés afin d'obtenir un mélange d'acides gras deutérés à 57 %. Un rendement de 57 mg/L d'acides gras (par litre de milieu de culture) a été obtenu. Le profil d'acides

gras était similaire à une culture témoin et avait un ratio lipides saturés/insaturés de 0,8 qui est semblable à une culture témoin avec un ratio de 0,7.

L'objectif ultime pour les marquages bactériens était d'effectuer un marquage endogène de la bactérie. Le marquage a donc été effectué avec les acides gras des lipides endogènes saponifiés, selon la masse molaire moyenne du mélange pour une concentration de 0,2 mM qui a été établie précédemment (0,1 mM PA-d<sub>31</sub> + 0,1 mM OA) avec des bactéries prélevées à la phase de croissance fin-log. Un marquage en acides gras deutérés de 26 (1) % a été obtenu pour les lipides exogènes et de 43 (1) % pour les lipides endogènes. Le marquage endogène permet le double du marquage exogène, car l'acide oléique froid dilue le marquage. Par contre, les acides gras incorporés sont partiellement deutérés à 57 %. Le ratio de lipides saturés/insaturés est de 0,78 (0,03) pour le marquage exogène et de 0,61 (0,01) pour le marquage endogène, comparativement au témoin de 0,71 (0,02). Le marquage endogène est donc plus riche de 4 % en acides gras insaturés que le témoin. Le marquage endogène a permis de mettre en évidence que des acides gras cyclopropylés à 19 carbones ont été métabolisés en acides gras cyclopropylés à 17 carbones. Il est à noter que le marquage endogène est effectué sur les acides gras saturés, insaturés ainsi que cyclopropylés, alors que le marquage exogène cible seulement les acides gras saturés. Le marquage endogène deutère donc de façon plus uniforme la membrane de la bactérie, et permet d'obtenir, par RMN du <sup>2</sup>H, des informations plus représentatives de l'ensemble de la membrane. Un M<sub>2</sub> de 2,1 (0,1) × 10<sup>9</sup> s<sup>-2</sup> est obtenu pour le marquage exogène et de 1,7 (0,1) × 10<sup>9</sup> s<sup>-2</sup> pour le marquage endogène. Dans tous les cas, la membrane est fluide et les marquages exogène et endogène n'altèrent pas la viabilité de la bactérie après les lavages, selon le test MTT. Le marquage exogène coûte, en PA-d<sub>31</sub>, 1 \$ par marquage et le marquage endogène revient à 50 \$ par marquage.

Nos travaux ont donc démontré que les marquages exogène et endogène sont deux bonnes avenues pour le marquage de la membrane d'*E. coli* au  $^2\text{H}$ . Ces marquages peuvent aider à l'étude de mécanismes d'action notamment d'un PAM sur les membranes des bactéries [8]. L'analyse de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux est envisageable et serait plus précise que le réactif MTT.

### Microalgue

Le premier objectif était de trouver les conditions optimales de marquage pour les microalgues. Ces conditions sont présentées en annexe D et ont été obtenues grâce à un marquage exogène qui emploie un mélange lipidique de cyanobactérie. Il a été démontré qu'une concentration de 0,1 mg/mL est suffisante et que le milieu de culture autotrophe (sans acétate) assure une meilleure incorporation. La cyanobactérie contient des LPS et les fractions de lipides polaires ont donc été utilisées. Une concentration de 0,125 mg/mL a été utilisée pour le marquage endogène pour compenser la présence de triglycérides. Par contre, il est possible que cette concentration soit insuffisante; ce paramètre peut encore être optimisé.

Le second objectif était de deutérer la microalgue pour ensuite pouvoir effectuer le marquage endogène. Des concentrations d'eau lourde de 60 % ont été testées, mais la croissance de la microalgue était trop lente. La concentration de 50 % en deutérium a donc été utilisée avec du bicarbonate de sodium non marqué à 0,1 %. Les lipides ont été extraits de la microalgue, et un rendement de 50 mg/L de lipides par litre de milieu de culture a été obtenu. Les acides gras des lipides sont deutérés à 49 %. La deutération n'a pas modifié le profil d'acides gras de la microalgue. L'amidon deutéré produit par la microalgue pourrait également être valorisé pour la production de glucose deutéré.

Le dernier objectif pour les microalgues était de comparer les résultats des marquages endogène et exogène. Un pourcentage de marquage de 20 % est obtenu pour le

marquage exogène et de 14 % pour le marquage endogène. Cette différence peut être attribuable à la pureté du lipide exogène utilisé; en effet les lipides endogènes contiennent également des lipides non polaires ainsi que des pigments. Le témoin a un pourcentage d'acides gras insaturés de 61 (0,4) % et le marquage exogène de 56 %, alors que le marquage endogène en a un de 62 (0,5) %. Le marquage endogène n'altère pas le profil d'acides gras, comme le marquage exogène. Le  $M_2$  du marquage exogène est  $2,2 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$  et celui du marquage endogène est de  $0,85 (0,02) \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ . Cette différence peut être expliquée par la présence d'insaturations sur les lipides deutérés pour le marquage endogène ainsi que par le fait que les têtes polaires des lipides endogènes sont également deutérées et peuvent faire abaisser le  $M_2$ . La POPC-d<sub>31</sub> utilisée contient seulement la fraction palmitate deutérée. Les différences de  $M_2$  pourraient aussi être causées par la présence de gouttelettes lipidiques au sein de la microalgue, possiblement causée par les triglycérides. Aucune différence entre le témoin et le marquage endogène n'a été notée pour l'évaluation de la viabilité par cytométrie en flux au moyen de l'autofluorescence de chlorophylle et du FDA avec 9,2 (0,1) cellules viables sur 10. Par contre, le marquage exogène présente 3,5 cellules viables sur 10. Il est à noter que cette dernière analyse n'a été effectuée qu'une seule fois et nécessite donc plus de réplicats. Le marquage exogène coûte 85 \$ par marquage et emploie même un lipide polaire deutéré plus abordable que ceux à tête sucrée, mais qui n'est pas dans le profil lipidique de la microalgue. Quant au marquage endogène, il coûte 65 \$ par marquage et ces coûts peuvent être réduits par le recyclage de l'eau lourde.

Le fluorophore *BODIPY*® se comporte comme un acide gras et pourrait être couplé sur le MGDG ou le DGDG ainsi que sur un triglycéride. Ces trois fluorophores pourraient être utilisés individuellement pour suivre le marquage dans la cellule par microscopie et visualiser si nous marquons plutôt la membrane plasmique, chloroplasmique ou tout simplement des gouttelettes lipidiques. Bien que ce fluorophore n'aura pas un

comportement endogène, il pourrait tout de même nous guider sur la qualité du marquage. Une telle approche est possible puisqu'elle a déjà été abordée par Dror Warschawski et Francesca Zito (CNRS, IBPC, Paris) avec des lipides fluorescents à tête PG (qui existent dans la microalgue) et PC (qui n'existent quasiment pas), confirmant le marquage de la membrane plasmique, mais aussi de ce qui semble être des gouttelettes lipidiques (résultats non publiés). Nous pourrions également employer la fraction polaire des lipides endogènes utilisés pour le marquage et évaluer ainsi l'influence des triglycérides.

À ce jour, aucune analyse de fluidité membranaire par RMN  $^2\text{H}$  de l'état solide sur *C. reinhardtii* n'a été effectuée. Il serait donc intéressant d'analyser l'impact d'un contaminant hydrophobe retrouvé dans les cours d'eau et qui pourrait donc avoir une affinité pour les membranes de la microalgue. Néanmoins, il faudra d'abord confirmer la présence, l'abondance et l'effet des gouttelettes lipidiques par microscopie ou cytométrie. Il faudra également évaluer le marquage exogène à la POPC avec deux autres réplicats. Le marquage avec les lipides endogènes est plus abordable que les lipides exogènes. L'utilisation de lipides endogènes avec un plus haut taux de deutération serait également appréciable pour augmenter le signal RMN.

#### Bactérie et microalgue

Il est intéressant de rappeler que le marquage de la membrane des bactéries et des microalgues avec un phospholipide aux chaînes acyles deutérées présente un  $M_2$  de  $2 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ , alors que le marquage des microalgues avec des lipides totalement deutérés (têtes sucrées et chaînes acyles) offre un  $M_2$  de  $1 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ . Il serait envisageable de saponifier des glycolipides froids et de greffer des chaînes acyles deutérées pour ensuite effectuer un marquage lipidique complémentaire chez les microalgues pour mettre en évidence la contribution des têtes sucrées deutérées sur le  $M_2$ . Il serait

également judicieux d'analyser les membranes de bactérie avec des phospholipides totalement deutérés.

Les analyses de RMN ont été effectuées avec une séquence d'écho de Hahn synchronisée avec la rotation à l'angle magique pour augmenter le signal. Cette rotation très rapide applique une pression sur les microorganismes. Une seconde stratégie pour augmenter le signal consiste à recycler une partie du signal lors de la relaxation entre les acquisitions, soit la méthode de *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG) [75]. Cette séquence est traditionnellement utilisée pour étudier la relaxation ou les noyaux à large écart quadripolaire. Cette séquence pour l'étude de la dynamique des membranes nécessite un développement méthodologique qui est en cours, et qui pourrait être prometteur.

Pour les deux microorganismes étudiés, le marquage endogène peut être économique, à condition de recycler l'eau lourde utilisée pour la deutération. Cette approche emploie des microorganismes sauvages. Les produits deutérés et commerciaux, ainsi que les mutants, peuvent être coûteux, alors que la méthodologie présentée emploie un mélange endogène de lipides partiellement deutérés qui est donc plus abordable ainsi qu'intrinsèquement naturel. L'emploi de la méthodologie nécessite un investissement en temps, mais ne requiert pas une expertise particulière. Ce projet ouvre alors la porte aux laboratoires à travers le monde pour l'analyse membranaire par RMN  $^2\text{H}$  à plus faible coût.

Les marquages ont été effectués avec un mécanisme d'incorporation actif via les acides gras et passif via les lipides totaux sur des cellules procaryotes et eucaryotes. Le projet ouvre donc la voie pour le marquage des membranes sur plusieurs types de cellules. Il en découle donc une foule d'applications tant dans le domaine médical ou environnemental pour l'étude de l'interaction d'un principe actif ou d'un contaminant

avec la membrane d'une cellule intacte. La RMN  $^2\text{H}$  des lipides membranaires de ces dernières permet de fournir des informations au niveau moléculaire qu'aucune autre technique ne peut donner et pouvant servir à mieux connaître des mécanismes d'actions de xénobiotiques.

## ANNEXE A

### PROTOCOLES SIMPLIFIÉS

Cette annexe présente certains protocoles en versions simplifiées de la section matériel et méthode (chapitre II).

A.1 Protocole de congélation (*E. coli*)Solution stérile

Milieu LB [50]: 10 g/L NaCl  
À autoclaver 10 g/L Peptone  
5 g/L d'extrait de levure  
pH équilibré à  $7,1 \pm 0,1$

Glycérol – LB: Autoclaver 19 g glycérol (via 1,26 g/mL) uniquement  
50% v/v Ajouter 15 mL Milieu LB

Gélose [50]

Gélose LB: Milieu LB  
À autoclaver Agar 15 g/L

Gélose EMB : 10 g/L Peptone  
À autoclaver 10 g/L Lactose  
2 g/L  $K_2HPO_4$   
pH est ajusté à  $7,1 \pm 0,2$  avec HCl ou NaOH (5 - 10 %)  
65 mg/L Bleu de méthylène  
500 mg/L Éosine Y  
Agar 15 g/L

## A.1 Protocole de congélation (*E. coli*) (suite)

### Protocole

- Inoculation d'une gélose LB et incubation de 18-24 h à 37 °C
- Transférer 3-5 colonies isolées dans 5 mL de LB dans un tube conique de 50 mL
- Incuber à 37 °C - 220 rpm environ 3-4 h pour une DO de 1,0 -1,5 (phase log)
- Transférer 3 mL de culture et mélanger avec 1 mL de glycérol 50 % (*Concentration finale en glycérol : 12,5 %*)
- Vortex et laisser reposer 15 minutes (Incorporation du glycérol)
- Transférer 300 µL dans un *Eppendorf* stérile sous la hotte (en moins de 15 minutes)
- Plonger dans azote liquide
- Transférer dans une boîte et entreposage à -80 °C

Vérification de congélation avec incubation d'une gélose LB via fil bouclé à 37 °C, puis incubation d'une colonie sur une seconde gélose EMB 24 h à 37 °C. La gélose LB doit avoir des colonies blanc crème et rondes toutes similaires et la gélose EMB doit avoir des colonies isolées noires et un reflet vert métallique.

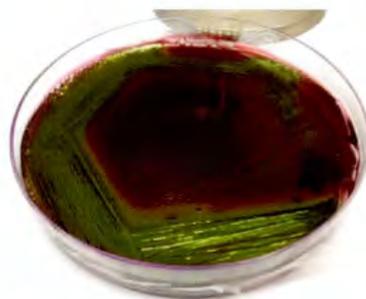


Figure A.1 Gélose EMB et ses reflets vert métallique

A.2 Cellule entièrement deutérée *E. coli* -  $^2\text{H}$ Milieu de culture minimal [26, 29]- *LeMaster and Richards (LR medium)*

- Buffer salt 10X :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  24 g/L et NaOH 1 g/L
  - Mineral salt 100x :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,676 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,3 g/L;  
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3 mg/L et  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10  $\mu\text{L/L}$
  - 0,5 % de glycérol
  - pH ajusté à 7 avec NaOH
- Les solutions de milieux de culture ont été mélangées, puis lyophilisées
  - Le milieu de culture a été reconstitué dans du  $\text{D}_2\text{O}$  70 %
  - Le milieu a été stérilisé par filtration 0,2  $\mu\text{m}$
  - Toutes les incubations sont à 37°C et 220 rpm dans un conique ou erlenmeyer, le volume de la culture est 20-25 % de celui du récipient
  - Les contrôles bactériens sont effectués sur des géloses LB et EMB

Exemple d'horaires de culture [52]

Jour 1 – 17h00 à jour 2	Préculture (LB)
Jour 2 – 09h30 à 11h00	Rafraîchissement culture (LB)
– 11h00 à 16h00	Acclimatation milieu de culture (LR $\text{H}_2\text{O}$ )
– 16h00 à jour 3	G1 : Acclimatation milieu de culture (LR $\text{D}_2\text{O}$ )
Jour 3 – 09h30 à 17h00	G2 : Inoculum pour G3 (LR $\text{D}_2\text{O}$ )
– 17h00 à jour 4	G3 : Culture finale
Jour 4 – 9h30-12h00	G3 : Récolte et lavage
	G3 : Lyophilisation (24-36 h)

## A.2 Cellule entièrement deutérée *E. coli* - $^2\text{H}$ (suite)

### Préculture et G1 [52]

- Préculture : 100  $\mu\text{L}$  *E. coli* congelé + 100 mL LB dans un erlenmeyer de 500 mL
- Incubation 1 nuit (16-18 h)
- Resuspendre par dilution la préculture ( $\text{DO}_{600}$ : 0,1) pour 5 mL LB dans conique
- Stop  $\text{DO}_{600}$  de 0,7-0,8 (~1,5 h); Centri 1200 g - 3 minutes
- Resuspendre dans 40 mL de LR  $\text{H}_2\text{O}$  dans erlenmeyer de 500 mL
- Stop  $\text{DO}_{600}$  de 0,7-0,8 (~4 h); Centri 1200 g - 3 minutes
- Resuspendre dans 25 mL de LR  $\text{D}_2\text{O}$  dans erlenmeyer de 250 mL ( $\text{DO}_{600}$  : 0,1)
- Laisser incuber une nuit (G1) ( $\text{DO}_{600}$  att. : ~4,5)
- Contrôle bactérien G1

### G2 [52]

- Resuspendre par dilution G1 ( $\text{DO}_{600}$  de 0,1) pour un volume de 40 mL LR  $\text{D}_2\text{O}$  dans un erlenmeyer de 500 mL
- Incuber 7-8 h ( $\text{DO}_{600}$  att. : ~2)
- Contrôle bactérien G2

### Culture finale (G3) [52]

- Volume nécessaire de G2 est centrifugé (1200 g - 3 minutes) pour 300-400 mL pour final  $\text{DO}_{600}$  : 0,1
- Incubation 100-133 mL de LR  $\text{D}_2\text{O}$  par erlenmeyer de 1000mL (jusqu'à 3 erlenmeyers)
- Laisser incuber une nuit ( $\text{DO}_{600}$  att. ~3-4)
- Contrôle bactérien G3
- Centri 4500 g – 15 minutes
- Récupérer  $\text{D}_2\text{O}$  pour distillation
- Rincer deux fois avec saline 0,85%
- Lyophiliser

## A.3 Extraction lipidique à haut rendement (150 - 300 mg bactéries lyophilisées)

Adaptation Folch [30, 31]

- 150 mg (max) de culot bactérien lyophilisé dans tube verre vissable de 50 mL (l'extraction peut se faire sur 300 mg dans une autre fiole vissable et combiner les surnageants dans l'ampoule)
- + 30 mL/fiole dichlorométhane-méthanol 2:1 (ratio volumique)
- Triturations des cellules avec spatule
- 10 cycles : (Soniquer sur tige à 12 W pendant 1 min sur glace et 30 sec de vortex)
- Centrifuger 50 g pendant 3 min
- Filtrer surnageant sous vide sur *Whatman*
- Transférer filtrat dans une ampoule à décanter
- Ajouter au culot 30 mL/fiole dichlorométhane-méthanol 2:1
- Effectuer 3 autres cycles de sonication
- Centrifuger 50 g pendant 3 min
- Transférer le surnageant filtré dans l'ampoule
- Rincer avec 15 mL de solvant le culot, filtrer et transférer dans l'ampoule
- Ajouter 20 mL KCl 0,88 % pour système de solvant dichlorométhane-méthanol-saline 2:1:0,8 (ratio volumique)
- Brassier 2 min et reposez 15 min
- Transférer la phase organique dans un ballon
- Rincer la phase aqueuse avec 20 mL de dichlorométhane
- Rota-évaporer jusqu'à 10 mL
- Évaporer sous azote à 40 °C
- Lyophiliser pendant 1h

Rendement attendu 12 mg/100 mg de bactéries lyophilisées

#### A.4 Saponification (de phospholipides à acides gras)

##### Protocole [55]

- 2 x (15 - 20 mg de lipides dans tube avec bouchon de 10 mL)
- + 2 mL KOH 0,5 M – MeOH 70 % /fiolle (3 mL KOH 1,5 M + 7 mL MeOH)
- Fermer le tube avec *Teflon* et chauffer 1h à 70 °C
- Laisser refroidir
- + 600  $\mu$ L HCl 2 N
- Extraction des acides gras (+ 2 mL n-hexane; vortexer 1 min; centri 100 g 1 min)
- Transférer la fraction d'hexane dans un autre tube de 10 mL en verre
- Répéter l'extraction une autre fois
- Lavage de l'hexane (+ 2 mL H<sub>2</sub>O nanopure, vortexer 1 min; Centri 100 g 1 min)
- La fraction aqueuse est éliminée (ou mise de côté si l'on veut par ailleurs étudier les têtes polaires des lipides) et l'opération de lavage est répétée une fois
- La fraction d'hexane est évaporée sous un jet d'azote à la température pièce (ne pas chauffer, ni lyophiliser les acides gras au risque qu'ils s'évaporent)

Rendement attendu 60 % m/m des lipides

## A.5 Extraction lipidique totale pour GC-MS (sur petite masse 5 - 30 mg)

Protocole [19, 31]

- La vaisselle est lavée trois fois avec le mélange de solvant utilisé
- L'échantillon lyophilisé est placé dans une éprouvette de 10mL avec un bouchon vissable
- Un volume de 4 mL de solvant d'extraction soit le dichlorométhane-méthanol 2 :1 (ratio volumique) est ajouté
- Soniquer sur glace avec une tige à 6 W pendant 30 secondes puis vortexer pendant 30 secondes
- L'opération est répétée une fois
- Le tube est alors centrifugé à 150 g pendant 2 min
- Le surnageant est transféré dans une éprouvette graduée de 15 mL en le filtrant sur laine de verre rincée
- L'extraction est répétée une fois et le surnageant est ajouté dans le même tube.
- Une solution de KCl à 0,88 % est ajoutée afin de respecter un ratio de volume de solvant d'extraction et de solution aqueuse de 3:0,8.
- Le tube est fermé avec un bouchon puis vortexé 30 secondes (la pression s'échappe)
- Centrifuger
- La phase inférieure est recueillie, puis évaporée sous un jet d'azote à 40 °C dans une fiole de 4 mL tarée
- L'échantillon est ensuite placé au lyophilisateur sous vide pendant 1h

## A.6 Méthylation (dérivation des phospholipides ou acides gras pour la GC-MS)

### Protocole [19, 31]

- Transférer les lipides extraits avec dichlorométhane dans fiole 10mL
- Évaporer à 40 °C sous jet d'azote
- + 2 mL de méthanol à 2 % d'acide sulfurique fraîchement préparé
- + 800 µL de toluène
- Fermer tube, bien étanché par un film de *teflon* entre le filetage et le bouchon
- Tube maintenu à 95-100 °C pendant 10 minutes
- Refroidir
- + 4 mL d'eau nanopure
- + 800 µL de n-hexane
- Vortexer 30 secondes et centrifuger à 150 g pendant 2 minutes
- Récupérer maximum d'hexane sans toucher à la phase aqueuse
- Transférer dans un vial de 4 mL pour évaporation sous azote à température ambiante
- Diluer dans le n-hexane pour une concentration de 2-5 mg/mL

## A.7 Préparation du milieu de culture minimum Tris et TAP

Préparation milieu de culture minimum Tris à autoclaver [57]

<i>Trizma</i> ® base (Tris base)	2,42 g/L
Solution <i>Bejerinck</i>	50 mL
Tampon phosphate 0,1 M pH 7	10 mL
Solution trace <i>Hutner</i>	1 mL
Volume complété à	1 L
pH ajusté avec HCl ou NaOH (5 – 10 %) à	7,3 ± 0,1

Min-Tris + NaHCO<sub>3</sub>

Minimum Tris + NaHCO <sub>3</sub>	1 g/L
Ajouter stérilement par filtration 0,2 µm	

TAP

Minimum tris + Anhydride acétique	1 g/L
-----------------------------------	-------

Solution *Beijerinck*

NH <sub>4</sub> Cl	8 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 g/L

Tampon phosphate 0,1 M pH 7

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,62 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,26 g/L
pH ajusté avec HCl ou NaOH (5 – 10 %) à 7,0	

Solution trace *Hutner*

Voir référence [76]

## ANNEXE B

### TABLEAUX ET FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

Les tableaux et les figures supplémentaires du chapitre III sont présentés dans cette section.

Tableau B.1 Paramètres expérimentaux pour le marquage à la phase mi-log exogène des réplicats de la section (3.1.4)

Date	Conc. (mM)	DO	T (h)	$M_2 \times 10^9 (s^{-2})$
20181114	0,09	1,79	2h30	2,679
20181023	0,01	1,65	2h40	2,090
20181017	0,02	1,61	2h30	2,604
20181018	0,05	1,6	2h20	2,306
20190613	0,05	1,82	2h35	1,800
20190704	0,05	2,04	2h30	1,595
20190704	0,10	1,93	2h30	1,760
20181023	0,10	1,62	2h35	2,325
20190613	0,10	1,88	2h35	1,449
20181018	0,19	1,55	2h20	11,73
20180912	0,19	1,7	2h25	10,60
20190620	0,19	1,73	2h15	2,007
20190605	0,20	1,65	2h00	3,146

Tableau B.2 Paramètres expérimentaux pour le marquage à la phase fin-log exogène des réplicats de la section (3.1.4)

Date	Conc. (mM)	DO	T (h)	$M_2 \times 10^9 (s^{-2})$
20190530	0,05	2,64	5h30	1,878
20190605	0,05	2,59	4h45	2,037
20181108	0,06	2,55	5h30	2,157
20181115	0,09	2,52	5h30	2,271
20190123	0,10	2,63	5h30	2,166
20190206	0,10	2,56	5h30	2,183
20190221	0,10	2,49	5h30	2,006
20181108	0,11	2,49	5h30	2,328
20190530	0,18	3,04	5h30	1,977
20181108	0,19	2,58	5h30	2,819
20190620	0,19	3,07	4h37	1,356
20190605	0,20	3,18	4h50	2,086

Tableau B.3 Densité optique ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) des réplicats de la section (3.1.4)

Conc. (mM)	Mi-log	Fin-log
0,05	1,8 (0,2)	2,6 (0,0)
0,10	1,8 (0,2)	2,5 (0,1)
0,19	1,7 (0,1)	3,0 (0,3)
Moyen	1,7 (0,1)	2,7 (0,2)

Tableau B.4 Paramètres expérimentaux des répliquats des marquage endogènes et exogènes de la section (3.2.4)

Marquage	Spectre	Date	DO <sub>600nm</sub>	Masse rotor (mg)
Exo	a	20190221	2,49	108
	b	20190206	2,56	108
	c	20190123	2,63	109
Endo	a	20190313	2,49	115
	b	20190306	2,43	114
	c	20190228	2,60	112

Tableau B.5 Second moment des trois répliquats des marquages exogène et endogène d'*E. coli* à la fin de la phase exponentielle de la section (3.2.4)

Spectre	M <sub>2</sub> (10 <sup>9</sup> s <sup>-2</sup> )	
	Exogène	Endogène
a	2,01	1,66
b	2,18	1,57
c	2,17	1,74
Moyen	2,12	1,66
Écart type	0,10	0,08

Tableau B.6 Viabilité sur le marquage exogène et endogène de la section (3.2.5)

Marquage	Spectre	Essai	Viabilité (%)	
			Moyenne	Écart-type
Exogène	a	55	100	44
	b	100		
	c	144		
Endogène	a	84	97	13
	b	109		
	c	97		

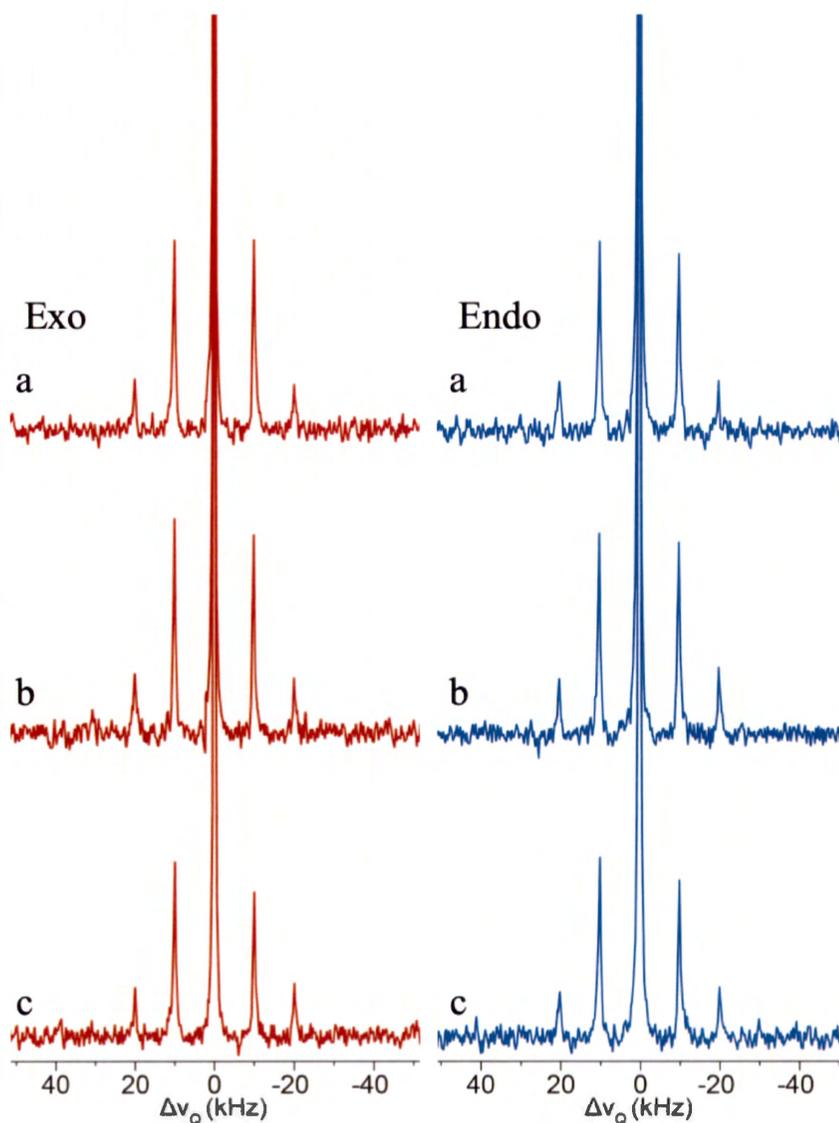


Figure B.1 Spectre de RMN- $^2\text{H}$  des trois répliqués des marquages exogène (gauche) et endogène (droite) d'*E. coli* à la fin de la phase exponentielle de la section (3.2.4)

Les acides gras sont solubilisés avec la DPC à 1 mM. Le marquage exogène est effectué à 0,1 mM PA- $\text{d}_{31}$  et OA. Le marquage endogène est effectué à 60 mg/L d'acides gras deutérés, semblable à la concentration du marquage exogène. Le temps de croissance est de 5h30 et correspond à une  $\text{DO}_{600\text{ nm}}$  de  $2,5 \pm 0,1$ . Les bactéries sont analysées à 37 °C pendant 53 minutes (1024 acquisitions) avec la rotation à l'angle magique à 10 kHz, à la suite d'une période d'équilibration de 15 minutes. Les détails des spectres analysés sont présentés en annexe B4 et B6.

Tableau B.7 Second moment ( $M_2$ ) pour le marquage exogène et endogène des microalgues à 25 °C de la section (3.3.3)

Spectre	$M_2$ ( $10^9$ s $^{-2}$ )	
	Exogène	Endogène
a	2,15	0,854
b	-	0,835
c	-	0,870
Moyen	2,15	0,853
Écart type	-	0,018

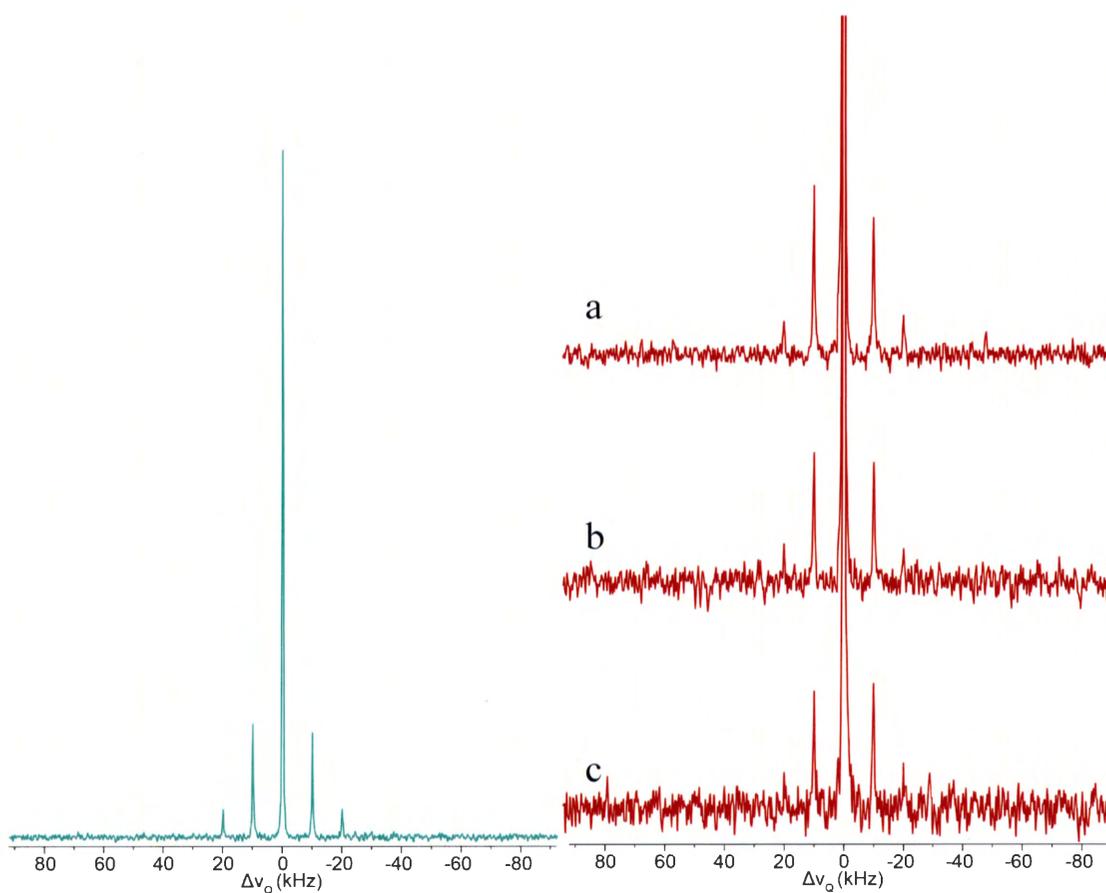


Figure B.2 Spectres de RMN- $^2$ H pour *C. reinhardtii* marquée avec les lipides exogènes (POPC) à gauche et endogène à droite à 25 °C de la section (3.3.3)

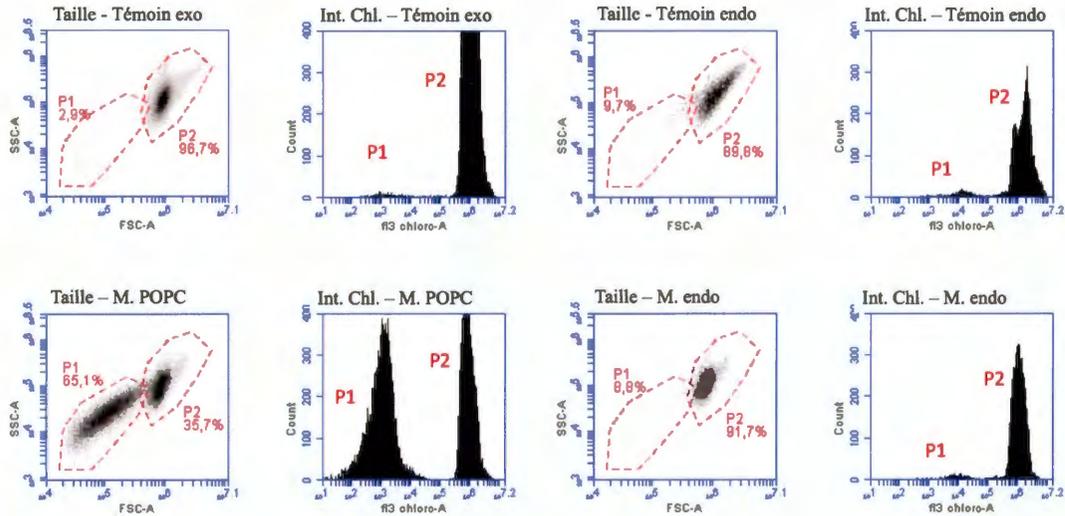


Figure B.3 Intensité de la chlorophylle en fonction de la population sélectionnée en fonction de la taille (FSC) et de la granulosité (SSC) pour le marquage exogène à la POPC et le marquage endogène et leurs témoins respectifs de la section (3.3.4)

Le nuage de point de taille déduite par la lumière diffusée vers l'avant (FSC) en fonction de la granulosité déduite par la lumière diffusée latéralement (SSC) est un indicateur sur la taille des objets analysés et de leur surface. La population P1 (faible) est considérée comme peuplée de plus petites cellules. Alors que la population P2 (saine) est peuplée de cellule plus grosse. L'intensité de la chlorophylle est compilée dans un histogramme pour chacune des deux populations et nous permet d'estimer la viabilité de la population.

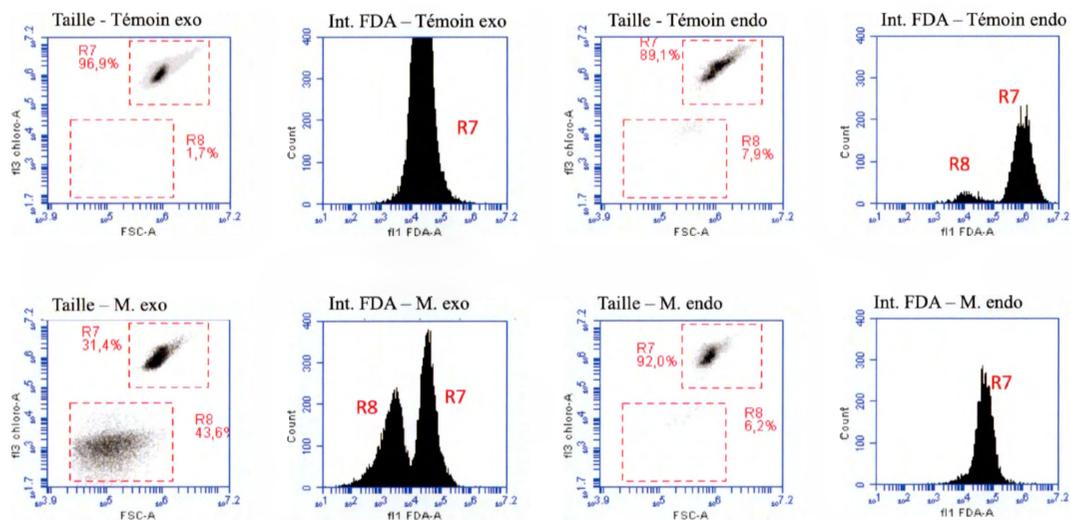
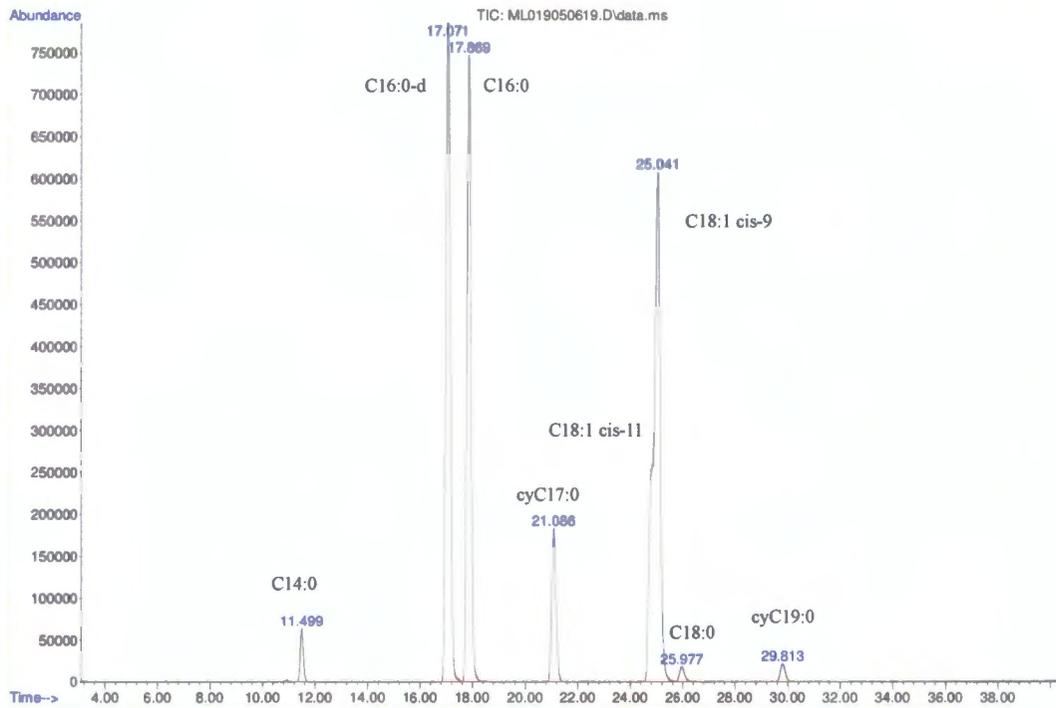
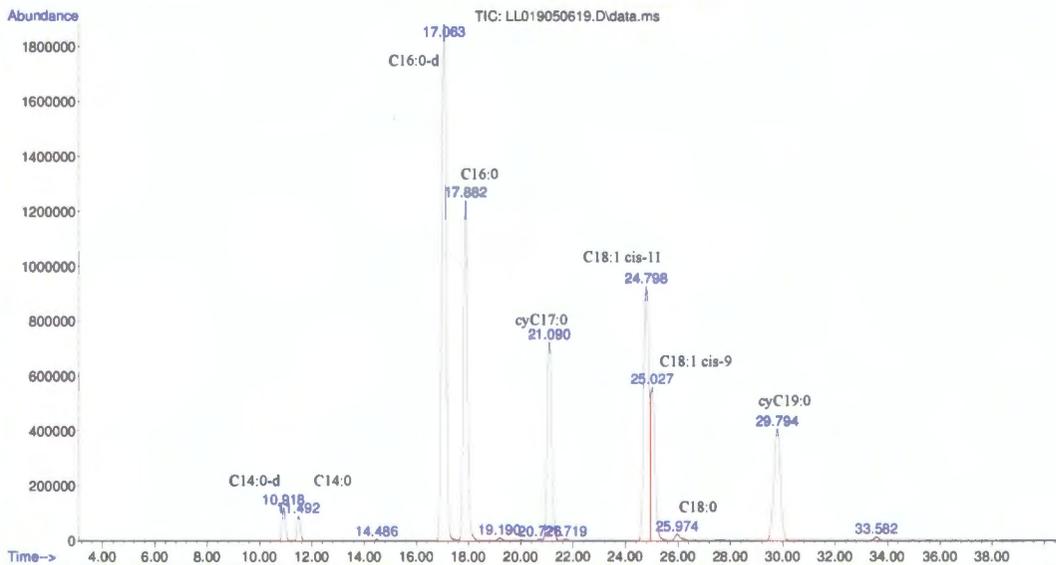


Figure B.4 Intensité du marqueur métabolique FDA en fonction de la région sélectionnée qui est en fonction de la taille (FSC) et de l'intensité de la chlorophylle pour le marquage exogène à la POPC et le marquage endogène et leurs témoins respectifs de la section (3.3.4)



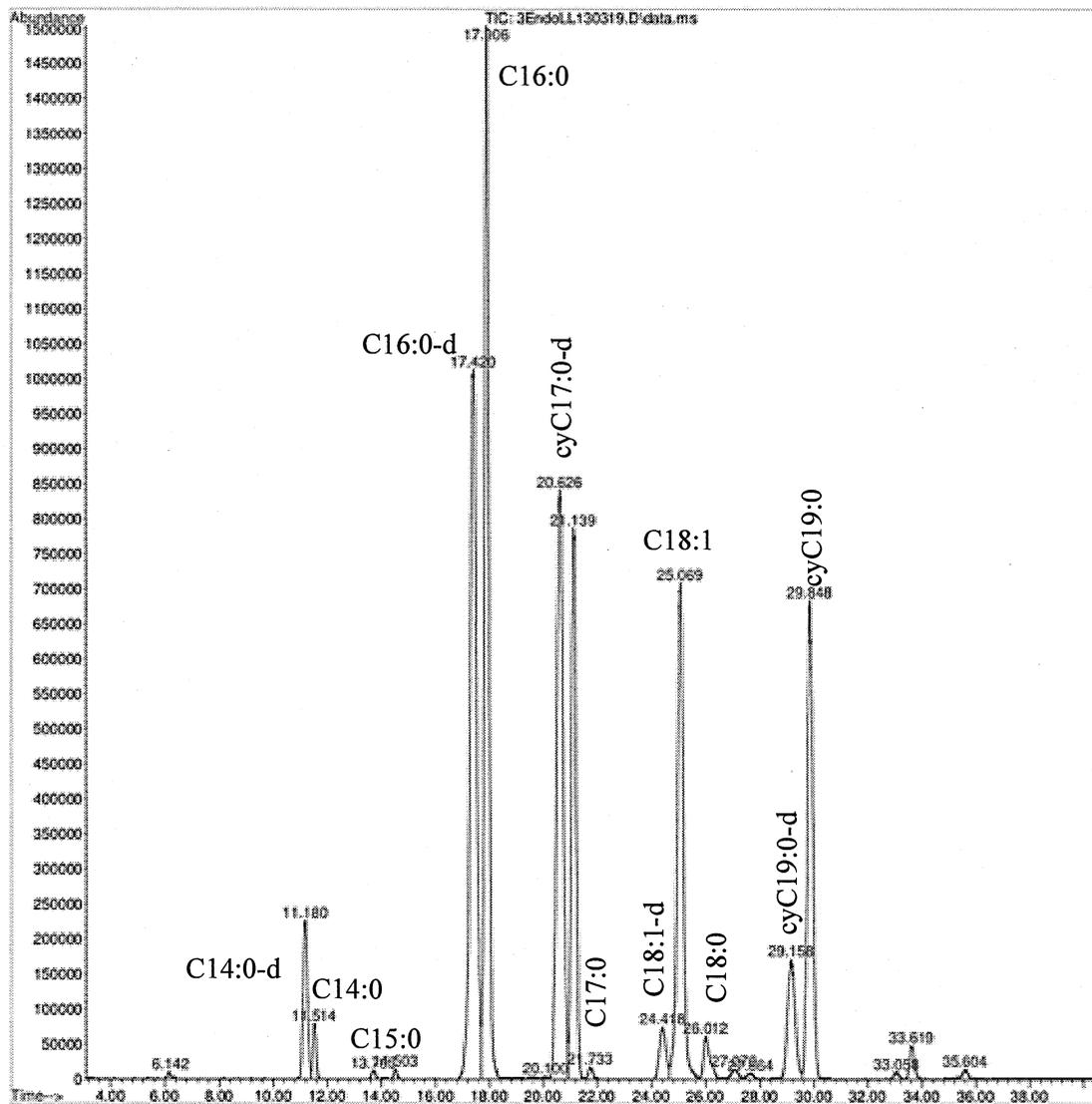
Chromatogramme B.1

Profil d'acides gras de la bactérie marquée à 0,19 mM (PA-d<sub>31</sub> et OA) à la phase mi-log de la section (3.1.2)



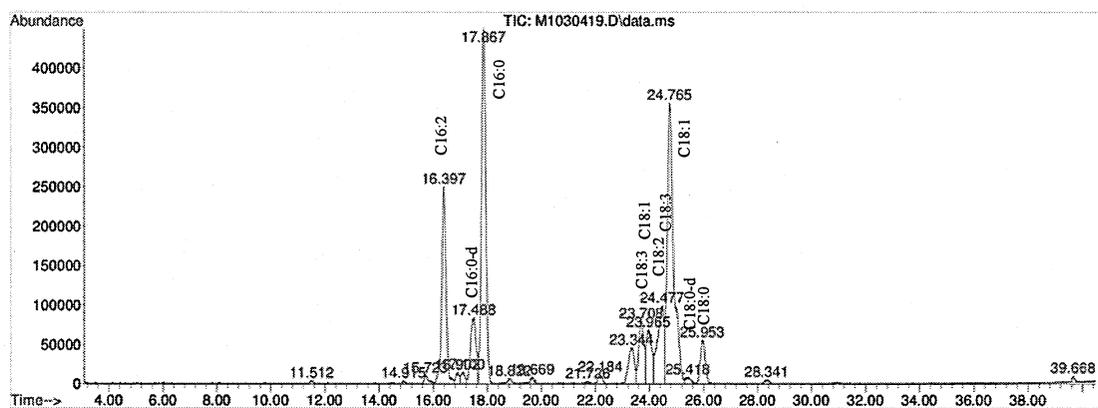
Chromatogramme B.2

Profil d'acides gras d'*E. coli* marquée à 0,19 mM (PA-d<sub>31</sub> et OA) à la phase fin-log de la section (3.1.2)



Chromatogramme B.3

Profil d'acides gras d'*E. coli* marquée avec les acides gras endogènes à 60 mg/L à la phase fin-log de la section (3.2.2)



Chromatogramme B.4

Profil d'acides gras de *C. reinhardtii* marquée avec les lipides endogènes à 12,5 mg/ 100 mL de la section (3.3.2)

## ANNEXE C

### MEMBRANE FLUIDE ET RIGIDE 0,19 mM (*E. coli*)

Cette section présente différents points qui ont été étudiés pour comprendre pourquoi la membrane d'*E. coli* peut parfois être rigide ou fluide à la concentration de 0,19 mM pour la phase de croissance à la mi-phase logarithmique. Elle présente également une étude de la solubilisation des acides gras

#### C.1 Paramètres expérimentaux testés

- L'agitation des bactéries dans l'incubateur avec un erlenmeyer de 500 mL et de 1000 mL a été étudiée. Le même volume dans un erlenmeyer plus grand offre une plus grande agitation, ce qui augmente l'oxygénation du milieu en accélérant la courbe de croissance et en augmentant un peu la densité optique maximale. Bien qu'il soit conseillé d'utiliser un volume de 10 %, un volume de 25 % est acceptable.
- La saline pour laver les bactéries a été substituée par un tampon PBS, et il n'y a pas eu de différence sur l'état membranaire des bactéries. La pression osmotique aurait possiblement fait varier la pression sur la cellule et donc la membrane.
- Afin d'écartier l'hypothèse d'un mutant ou d'une contamination, la souche de bactéries résistantes à l'ampicilline a été remplacée par une seconde souche vierge. Il n'y a pas eu de différence sur l'état membranaire.

- Des contrôles de contamination bactérienne ont été appliqués systématiquement pour écarter l'effet d'une contamination sur les résultats obtenus, incluant l'utilisation d'une galerie API pour valider l'apparence de l'espèce sur gélose sélective EMB. Une gélose nutritive a été ensemencée après chaque marquage pour rechercher une contamination par différence de morphologie et un milieu EMB pour confirmer l'espèce.
- Pour évaluer la présence d'une contamination chimique, un changement de la source d'eau nanopure utilisée pour effectuer le milieu de culture a été effectué. La DPC, les lipides ont aussi été substitués. Il n'y a pas eu de différence. Le pH du milieu de culture a été vérifié de 6,8 à 7,4.
- Lorsque la solution des lipides et de détergents est effectuée avec le *Tween* après les cycles de gel et de dégel, un culot peut être observé lorsque nous centrifugeons la solution dans les mêmes conditions que les bactéries. Un gradient de *Percoll* a donc été mis au point. Le gradient, qui respecte la force ionique appropriée pour les bactéries, permet de récupérer les bactéries au fond du tube en conservant en suspension le dépôt qui est observé suite à la centrifugation de la solution de lipides et de *Tween* (voir manipulations détaillées en C.3)
- La DPC, un détergent plus robuste a donc été privilégié afin d'éviter la contamination de cristaux d'acide palmitique dans l'échantillon qui viendraient alors modifier le second moment. La bactérie tolère bien la DPC et son utilisation est donc plus fiable.
- La façon de remplir le rotor a également été analysée. Il n'existe pas de différence si nous utilisons la centrifugeuse à 1500 g pour bien remplir le rotor ou la petite centrifugeuse de table.

## C.2 Synthèse

La cause exacte n'a pas été identifiée, mais il a été établi qu'il est mieux de travailler avec une concentration de 0,10 mM, et même de récolter les bactéries à la fin de la phase logarithmique.

### C.3 Détergent utilisé (DPC et *Tween-20*)

Le protocole de [19] utilise la DPC à 1 mM, un détergent zwitterionique pour solubiliser les acides gras en milieu aqueux. Le *Tween-20* a été testé comme détergent non ionique à 0,15 mM selon ce protocole [14]. Les acides gras testés étaient l'acide palmitique et oléique à 0,1 mM. Les acides gras ainsi que le détergent 15 fois plus concentré sont ajoutés dans le milieu de culture. Trois cycles thermiques ont été appliqués de 95-99 °C dans un bain-marie puis plongés dans de l'azote liquide.

Une fraction (10 mL) des solutions 15 fois concentrées et diluées (10 mL) à 1 fois dans le milieu de culture ont été incubées à 37 °C pendant 20 minutes. Les solutions ont par la suite été centrifugées dans les mêmes conditions que les bactéries, soit à 1500 g pendant 10 minutes à 4 °C. Un léger culot blanchâtre est remarqué pour les tubes 15 fois concentrés et dilués avec le *Tween-20* comme détergent. Aucun culot n'est remarqué pour les tubes d'acides gras avec la DPC.

Un gradient de *Percoll* a été effectué dans une saline à 0,9 % [77]. Une première solution stock a été préparée avec 9 mL de *Percoll* et 1 mL d'une solution de chlorure de sodium (NaCl) 1,5 M pour une densité de 1,123 g/mL. Cette solution est mélangée avec un volume égal de saline à 0,15 mM pour une densité finale de 1,063 g/mL. Le gradient est réalisé en centrifugeant 10 mL de la dernière solution dans un tube de 15 mL à 4500 g pendant 30 minutes. La solution à séparer est délicatement ajoutée sur le dessus du gradient.

Un culot bactérien a été suspendu dans 1 mL de la solution d'acides gras et de *Tween-20* à 15 fois concentré. Cette solution a été centrifugée sur le gradient de densité suivant pendant 10 minutes à 4500 g à 4 °C. Une bande « nuageuse » diffuse a été séparée du culot bactérien à travers le gradient.



## ANNEXE D

### Marquage exogène naturel (*C. reinhardtii*)

Le marquage exogène naturel est une stratégie utilisée qui est plus adaptée pour un organisme vivant que le marquage purement exogène. En effet, la source de lipides n'est pas pure, elle est diversifiée comme dans la nature. Cette annexe présentera donc les résultats obtenus ainsi que l'optimisation de la méthodologie pour le marquage de la membrane de *C. reinhardtii*, une microalgue eucaryote, au moyen de lipides exogènes naturels extraits d'*A. quadruplicatum*, une cyanobactérie.

#### D.1 Extrait lipidique deutéré d'*A. quadruplicatum*

*Agnemellum quadruplicatum* est une cyanobactérie qui a été sélectionnée par l'entreprise *Fesko Consultant inc.*, car elle s'adapte rapidement à un environnement deutéré et qu'elle produit une grande quantité d'amidon lorsqu'elle est déplétée en azote. Elle est donc une bonne candidate pour produire majoritairement du glucose deutéré.

Le mélange lipidique d'*A. quadriplicatum* deutéré que nous a offert la compagnie a été effectué par une extraction de *Folch* modifié sur les cellules lyophilisées. L'extraction a été effectuée à reflux avec dichlorométhane-méthanol 2:1 (ratio volumique) sous agitation pendant une nuit. Bien que les lipopolysaccharides (LPS) sont normalement extraits à l'aide d'une solution aqueuse de phénol chaude, il est possible qu'une fraction soit présente dans les extraits lipidiques totaux. Il est à noter que lors de la séparation de l'extrait total sur une colonne, un produit orangé à caractère dense et collant s'accumulait au-dessus de la silice.

Les lipides polaires ont été extraits du mélange lipidique au moyen d'une séparation sur silice. Environ 300 mg du mélange lipidique lyophilisé a été dissout dans 1,25 mL d'un mélange dichlorométhane-méthanol 98:2, puis déposé sur une colonne de 100 mL de silice *ZéoPrep* 60-200  $\mu\text{m}$  préalablement conditionnée au méthanol ainsi qu'au dichlorométhane-méthanol 98:2. Les lipides non polaires ont été élués avec le mélange de dichlorométhane-méthanol 98:2 jusqu'à l'élimination d'élution colorée, par la suite les lipides polaires ont été récoltés dans plusieurs fractions avec du méthanol. Environ 37 % de l'échantillon est composé de lipide polaire. Les solvants utilisés sont de grade HPLC.

Une fraction contenant des lipides polaires tels que les galactolipides, phospholipides ainsi que quelque trace de pigments a été récupérée. Les galactolipides ont été identifiés sur CCM avec un révélateur d'orcinol -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  70 % et les phospholipides ont été identifiés par le révélateur de *Dittmer* au bleu de molybdène.

L'extrait lipidique a été utilisé tel quel avec possiblement des LPS, ou seulement avec les fractions polaires avec des têtes polaires glycosylées et phosphatées.

Tableau D.1 Lipides retrouvés chez *A. quadruplicatum* d'après la littérature [78]

Fraction	Tentative d'identification
Neutre	Mono-,di, triglycérides Chlorophylle/ Caroténoïdes
Polaire	Monoglycosyl diglycéride Pigments
Très polaire	Diglycosyl diglycéride Phosphatidyl glycéride Sulfoquinovosyl diglycéride

Tableau D.2 Distribution des acides gras (en pourcentage) retrouvés dans les fractions de lipides chez *A. quadruplicatum* cultivé à 39 °C d'après la littérature [79]

Acides gras	Neutre	Glycolipides	Très polaire
12:0	100		
16:0		40	60
16:1	2	49	49
18:0		53	47
18:1	1	46	53
18:2		54	46
18:3		44	56

Selon cette étude, les acides gras de la fraction neutres sont très courts. Par contre, les acides gras des lipides polaires ont un profil lipidique plus apparenté à *C. reinhardtii*.

## D.2 Mélange lipidique hydraté

Un premier spectre deutérium a été effectué sur les lipides polaires extraits de la cyanobactérie. Ces lipides ont été hydratés, puis analysés directement.

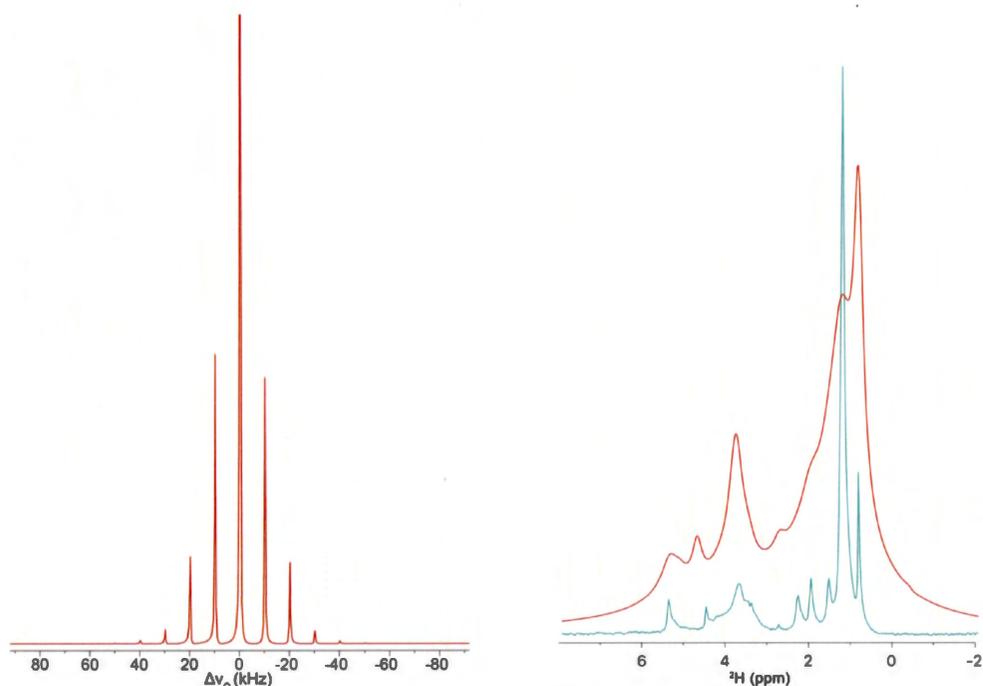


Figure D.1 Spectre  $^2\text{H}$  solide avec MAS à gauche et son agrandissement de la bande centrale à droite (rouge) superposé du spectre  $^2\text{H}$  en solution (vert) de lipide polaire hydraté de *A. quadruplicatum*

Sur le premier spectre de gauche, nous voyons les bandes de rotation dues aux interactions quadripolaires. La rotation à l'angle magique de 10 kHz moyenne une partie des interactions quadripolaires de 80 kHz et les interactions dipolaires jusqu'à 4 kHz qui ont une dépendance angulaire, en augmentant le signal. Lorsque nous effectuons un agrandissement sur la bande centrale, nous pouvons voir les interactions plus fines du déplacement chimique de moins de 1 kHz qui n'ont pas de dépendance angulaire. La figure de droite représente un spectre en solution des lipides deutérés avec toutes leurs dynamiques et l'agrandissement du spectre solide en MAS. Comparativement au spectre en solution, sur le spectre MAS, il est possible que le pic le plus à droite des méthyles soit plus intense que ceux des méthylènes pour des raisons de dynamique. Le second moment calculé à partir du spectre  $^2\text{H}$  est de  $3,3 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ .

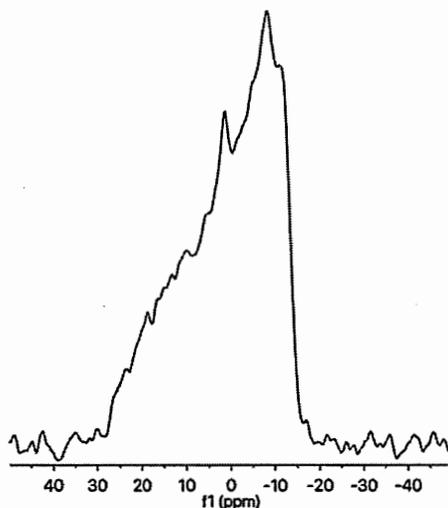


Figure D.2 Spectre RMN solide  $^{31}\text{P}$  à 162 MHz de lipides polaires hydratés de *A. quadruplicatum* à 20 °C (2148 acquisitions)

Le spectre statique en phosphore présente une phase lamellaire avec un petit pic isotrope qui confirme que les lipides sont presque entièrement hydratés en phase lamellaire.

### D.3 Étude la membrane dans une condition extrême

Dans un premier temps, une expérience de marquage exogène naturel a été réalisée pour vérifier la méthode. Un marquage a été effectué avec la fraction de lipides polaires à 0,3 mg/mL. Les cellules saines ont été analysées ainsi que des cellules lyophilisées.

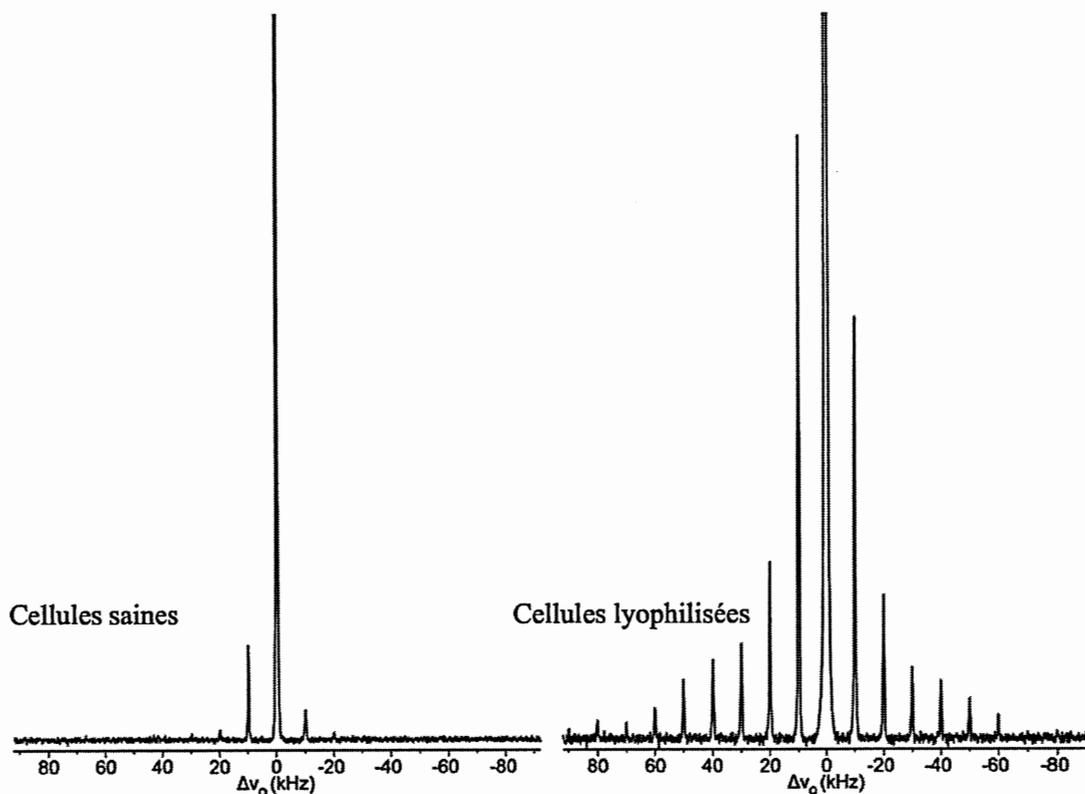


Figure D.3 Spectre RMN solide  $^2\text{H}$  à 61 MHz de *C. reinhardtii* marquée avec des lipides deutérés extraits de *A. quadruplicatum* à 0,3 mg/mL et à 20 °C

L'allure du spectre des cellules lyophilisées présente plus de bandes de rotation, car les éclatements quadripolaires sont plus intenses que celui des cellules saines indiquant une dynamique réduite. En effet, une membrane sur une cellule lyophilisée peut s'apparenter à un raisin sec et est donc plus rigide.

Tableau D.3 Analyse des seconds moments de *C. reinhardtii* marquée avec des lipides deutérés extraits de *A. quadruplicatum*

Cellule	$M_2$ ( $10^9 \text{ s}^{-2}$ )
Saine	0,8
Lyophilisée	9

L'analyse du second moment permet d'avoir une bonne indication numérique sur l'état de la membrane. Nous pouvons constater que le second moment de la cellule lyophilisée est plus de 10 fois supérieur à la cellule saine. Il est également supérieur à celui des lipides purs hydratés.

#### D.4 Concentration lipidique minimale

Afin de déterminer quelle fraction lipidique nous devons utiliser pour effectuer le marquage endogène de *C. reinhardtii*, une analyse préliminaire a été effectuée avec ceux d' *A. quadruplicatum*. Deux concentrations lipidiques ont été utilisées pour les extraits total et polaire de lipides deutérés de *A. quadruplicatum*. La figure D.4 présente quatre échantillons de *C. reinhardtii* marqués avec les extraits lipidiques de *A. quadruplicatum*. Les valeurs du tableau D.4 ont été calculées à l'aide des spectres présentés. La valeur numérique du rapport signal sur bruit a été calculée sur le pic central ainsi que différentes bandes de rotation.

Tableau D.4 Analyse du rapport signal sur bruit et des seconds moments de *C. reinhardtii in vivo* marquée avec des lipides deutérés extraits de *A. quadruplicatum*

Lipide	Conc. (mg/mL)	Signal/Bruit					M <sub>2</sub> (10 <sup>9</sup> s <sup>-2</sup> )
		Central	1re BR	2e BR	3e BR	4e BR	
Polaire	0,1	1450	19	6	1	1	0,66
	0,3 <sup>a</sup>	3321	31	8	2	1	0,49
Totaux	0,1	2910	44	14	3	2	0,82
	0,3	5425	98	43	13	6	1,36

<sup>a</sup> Signal/bruit enregistré de 8192 acquisitions et calculé avec un facteur de correction de 1,118 pour comparer avec les autres spectres

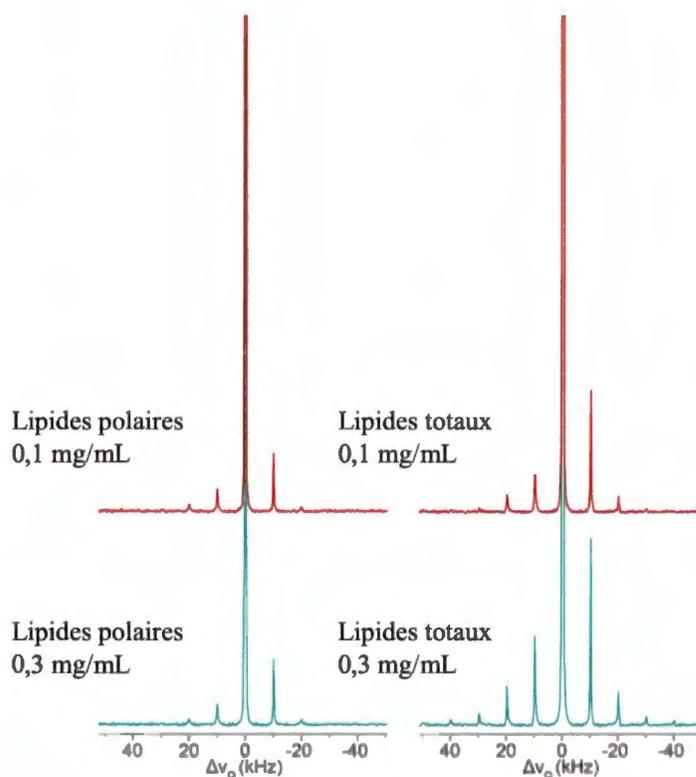


Figure D.4 Spectre RMN solide  $^2\text{H}$  à 92 MHz de *C. reinhardtii in vivo* marquée avec des lipides totaux et polaires deutérés à différentes concentrations, extraits de *A. quadruplicatum* à 25 °C (10240 acquisitions)

L'intensité du signal sur la figure a été préservée pour chaque spectre afin de comparer l'efficacité du marquage. Avec le marquage de lipides polaires et totaux, l'intensité de la bande centrale avec plus de mouvements isotropes a doublé avec une concentration trois fois plus élevée en lipide.

Les secondes bandes de rotation pour les lipides polaires sont affectées d'un plus faible ordre de grandeur que pour les lipides totaux. La valeur du second moment pour la plus grande concentration de lipides polaires est plus faible que pour la concentration plus faible, ce qui peut être expliqué par la valeur importante de la bande centrale dans le calcul du second moment.

En ce qui concerne les bandes de rotation des lipides totaux, elles sont nettement supérieures pour la concentration plus élevée en lipide. Le second moment des lipides totaux tend à augmenter avec la concentration. Le nombre de bandes de rotation sur le spectre tend également à augmenter.

#### D.5 Tentative pour augmenter le signal

Afin de tenter d'augmenter le signal, un détergent non ionique (*Tween-20*) a été utilisé pour dissoudre les lipides au lieu d'utiliser la sonication. Deux milieux de culture ont également été testés. La différence entre les deux milieux de culture est la forme de carbone ajouté. Dans le TAP (Tris-Acétate-Phosphate), il s'agit d'acétate et dans le Tris (TP), il s'agit de bicarbonate. La forme de carbone est plus rapidement assimilée et permet à la microalgue de produire plus de lipides ainsi que d'amidon. Un meilleur signal est obtenu dans le milieu TP.

Les valeurs du tableau D.5 ont été calculées à l'aide des spectres présentés à la figure D.5. La valeur numérique du signal sur bruit a été calculée sur le pic central ainsi que différentes bandes de rotation.

Tableau D.5 Analyse du signal sur bruit et des seconds moments de *C. reinhardtii* *in vivo* marquée avec des lipides deutérés extraits de *A. quadruplicatum* à 0,1 mg/mL

Milieu de culture	Signal/Bruit					M <sub>2</sub> (10 <sup>9</sup> s <sup>-2</sup> )
	Central	1re BR	2e BR	3e BR	4e BR	
TAP	1920	37	17	5	4	0,85
+ <i>Tween-20</i>	440	8	5	1	2	0,74
TP	830	62	24	8	4	2,3
+ <i>Tween-20</i>	540	26	11	4	2	1,7

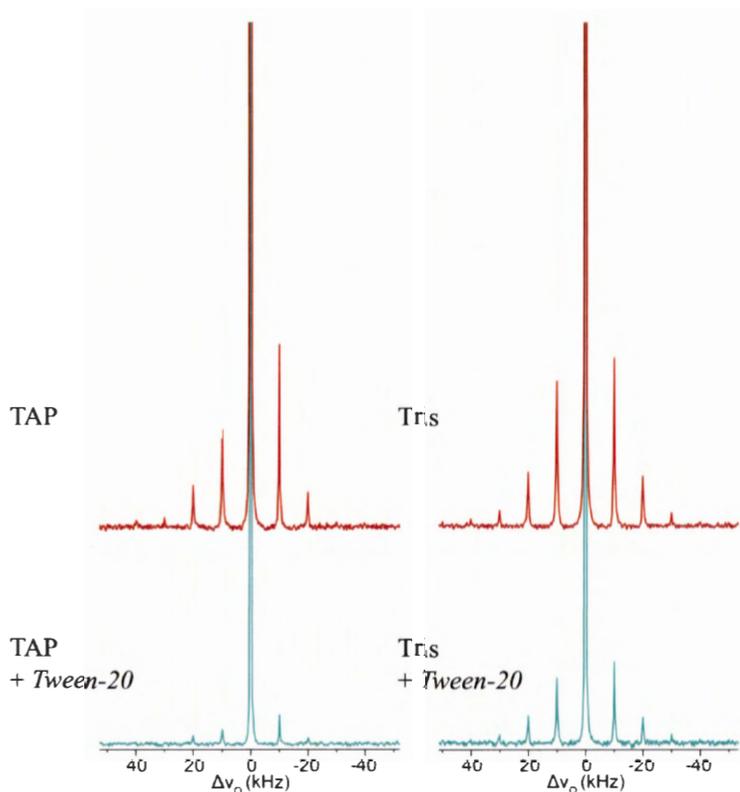


Figure D.5 Spectre de RMN- $^2\text{H}$  solide  $^2\text{H}$  à 92 MHz de *C. reinhardtii in vivo* marquée dans deux milieux de culture avec des lipides totaux deutérés à 0,1 mg/mL extrait de *A. quadruplicatum* à 25 °C (10240 acquisitions)

Le détergent non ionique *Tween-20* tend à faire diminuer de manière systématique le signal/bruit. Il a un effet plus important sur le TAP. Il provoque une réduction d'environ 80 % sur les bandes de rotation (1 à 3) pour le milieu de culture TAP et de 50 % sur le milieu de culture Tris. La réduction du second moment est comparable à celle observable pour la différence de concentration de lipide total utilisée dans le tableau précédent. Lorsque nous utilisons le milieu de culture sans acétate, nous pouvons observer que le signal du pic central est réduit de moitié. Par contre, les bandes de rotation (1 à 3) sont environ 50 % plus grandes, ce qui se traduit par un dédoublement du second moment. Le *Tween-20* n'est donc pas nécessaire.

#### D.6 Spécificité du marquage

Suite aux marquages avec les lipides deutérés, les lipides ont été extraits et les résidus lyophilisés ont été analysés. Il n'y a pas de signal en RMN  $^2\text{H}$ , le spectre n'est donc pas présenté. Le marquage est donc spécifique et la microalgue n'a pas anabolisé les lipides.

#### D.7 Synthèse des résultats

Le signal est plus intense pour les microalgues marquées dans le milieu de culture sans acétate, soit le milieu minium tris supplémentés en bicarbonate de sodium. La présence de l'acétate augmente également le signal de la bande centrale qui pourrait être peuplée de gouttelettes lipidiques. L'utilisation de détergent pour solubiliser les lipides réduit le marquage. La sonication des lipides est donc la meilleure technique pour les solubiliser. La concentration de lipide totaux de 0,1 mg/mL est suffisante pour un marquage, bien que la concentration de 0,3 mg/mL offre un meilleur signal. Les lipides polaires sans LPS de la cyanobactérie semblent être une bonne avenue pour marquer les membranes de la microalgue eucaryote de *C. reinhardtii*.

## RÉFÉRENCES

- [1] J.S.H. Stephen R. Bolsover, Elizabeth A. Shephard, Hugh A. White, Claudia G. Wiedemann *et al.*, *Biologie cellulaire et moléculaire*, 608 pages, Dunod, Paris, 2006.
- [2] M. Luckey, *Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations*, 423 pages, Cambridge University Press, San Francisco, 2014.
- [3] D. Lingwood, K. Simons, Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science* 327(5961) (2010) 46-50.
- [4] R.M. Epanand, R.F. Epanand, Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents, *Molecular BioSystems* 5(6) (2009) 580-587.
- [5] E. Schechter, *Biochimie et biophysique des membranes: aspects structuraux et fonctionnels*, 466 pages, Masson, Paris, 1990.
- [6] N. Mykytczuk, J. Trevors, L. Leduc, G. Ferroni, Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 95(1-3) (2007) 60-82.
- [7] M.E. Ericson, C.O. Rock, Membrane formation and regulation, *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes* (2019) 763-773.
- [8] V. Booth, D.E. Warschawski, N.P. Santisteban, M. Laadhari, I. Marcotte, Recent progress on the application of  $^2\text{H}$  solid-state NMR to probe the interaction of antimicrobial peptides with intact bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* (2017).

- [9] J. Hellou, S. Steller, J. Leonard, M.A. Langille, D. Tremblay, Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between water and particles compared to bioaccumulation in mussels: a harbour case, *Marine Environmental Research* 59(2) (2005) 101-117.
- [10] M.-A. Sani, F. Separovic, How membrane-active peptides get into lipid membranes, *Accounts of Chemical Research* 49(6) (2016) 1130-1138.
- [11] S.S. Leung, J. Thewalt, Link between fluorescent probe partitioning and molecular order of liquid ordered-liquid disordered membranes, *The Journal of Physical Chemistry B* 121(6) (2017) 1176-1185.
- [12] Y. Tu, M. Lv, P. Xiu, T. Huynh, M. Zhang, M. Castelli, Z. Liu, Q. Huang, C. Fan, H. Fang, Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets, *Nature Nanotechnology* 8(8) (2013) 594.
- [13] R.E.W. Hancock, H.-G. Sahl, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nature Biotechnology* 24(12) (2006) 1551-1557.
- [14] Z. Bouhleh, A.A. Arnold, D.E. Warschawski, K. Lemarchand, R. Tremblay, I. Marcotte, Labelling strategy and membrane characterization of marine bacteria *Vibrio splendidus* by in vivo  $^2\text{H}$  NMR, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1861(4) (2019) 871-878.
- [15] X.L. Warnet, M. Laadhari, A.A. Arnold, I. Marcotte, D.E. Warschawski, A  $^2\text{H}$  magic-angle spinning solid-state NMR characterisation of lipid membranes in intact bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858(1) (2016) 146-152.
- [16] M. Laadhari, A.A. Arnold, A.E. Gravel, F. Separovic, I. Marcotte, Interaction of the antimicrobial peptides caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact bacteria by  $^2\text{H}$  solid-

state NMR, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858(12) (2016) 2959-2964.

[17] J.H. Davis, C.P. Nichol, G. Weeks, M. Bloom, Study of the cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* by deuterium magnetic resonance, *Biochemistry* 18(10) (1979) 2103-2112.

[18] J. Pius, M.R. Morrow, V. Booth,  $^2\text{H}$  Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Investigation of Whole *Escherichia coli* Interacting with Antimicrobial Peptide MSI-78, *Biochemistry* 51(1) (2012) 118-125.

[19] C. Tardy-Laporte, A.A. Arnold, B. Genard, R. Gastineau, M. Morançais, J.-L. Mouget, R. Tremblay, I. Marcotte, A  $^2\text{H}$  solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828(2) (2013) 614-622.

[20] X. Zhao, L. Jarboe, Z. Wen, Utilization of pyrolytic substrate by microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: cell membrane property change as a response of the substrate toxicity, *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(9) (2016) 4241-4251.

[21] T. Debenest, F. Gagné, A.-N. Petit, M. Kohli, P. Eullafroy, C. Blaise, Monitoring of a flame retardant (tetrabromobisphenol A) toxicity on different microalgae assessed by flow cytometry, *Journal of Environmental Monitoring* 12(10) (2010) 1918-1923.

[22] A. Aksmann, Z. Tukaj, Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: a fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 strain, *Chemosphere* 74(1) (2008) 26-32.

[23] F. Azadi-Chegeni, C. Schiphorst, A. Pandit, In vivo NMR as a tool for probing molecular structure and dynamics in intact *Chlamydomonas reinhardtii* cells, *Photosynthesis Research* 135(1-3) (2018) 227-237.

- [24] A.A. Arnold, J.-P. Bourgoïn, B. Genard, D.E. Warschawski, R. Tremblay, I. Marcotte, Whole cell solid-state NMR study of *Chlamydomonas reinhardtii* microalgae, *Journal of Biomolecular NMR* 70(2) (2018) 123-131.
- [25] J.-T. Wu, Y.-R. Chiang, W.-Y. Huang, W.-N. Jane, Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria, *Aquatic Toxicology* 80(4) (2006) 338-345.
- [26] O. Paliy, T.S. Gunasekera, Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents, *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(5) (2007) 1169-1172.
- [27] H.L. Crespi, S.M. Archer, J.J. Katz, Culture of algae and other micro-organisms in deuterium oxide, *Nature* 184(4687) (1959) 729-730.
- [28] V. Laux, P. Callow, D.I. Svergun, P.A. Timmins, V.T. Forsyth, M. Haertlein, Selective deuteration of tryptophan and methionine residues in maltose binding protein: a model system for neutron scattering, *European Biophysics Journal* 37(6) (2008) 815-822.
- [29] D.M. LeMaster, F.M. Richards, Preparative-scale isolation of isotopically labeled amino acids, *Analytical Biochemistry* 122(2) (1982) 238-247.
- [30] J. Folch, M. Lees, G. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry* 226(1) (1957) 497-509.
- [31] F. Pernet, R. Tremblay, Effect of ultrasonication and grinding on the determination of lipid class content of microalgae harvested on filters, *Lipids* 38(11) (2003) 1191-1195.

- [32] O. Tenaillon, D. Skurnik, B. Picard, E. Denamur, The population genetics of commensal *Escherichia coli*, *Nature Reviews Microbiology* 8(3) (2010) 207.
- [33] J.B. Kaper, J.P. Nataro, H.L. Mobley, Pathogenic *Escherichia coli*, *Nature Reviews Microbiology* 2(2) (2004) 123.
- [34] L.A. Clifton, S.A. Holt, A.V. Hughes, E.L. Daulton, W. Arunmanee, F. Heinrich, S. Khalid, D. Jefferies, T.R. Charlton, J.R. Webster, An accurate *in vitro* model of the *E. coli* envelope, *Angewandte Chemie International Edition* 54(41) (2015) 11952-11955.
- [35] M. Alcorlo, S. Martínez-Caballero, R. Molina, J.A. Hermoso, Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases, *Current Opinion in Structural Biology* 44 (2017) 87-100.
- [36] A. Silipo, R. Lanzetta, A. Amoresano, M. Parrilli, A. Molinaro, Ammonium hydroxide hydrolysis a valuable support in the MALDI-TOF mass spectrometry analysis of Lipid A fatty acid distribution, *Journal of Lipid Research* 43(12) (2002) 2188-2195.
- [37] D. Oursel, C. Loutelier - Bourhis, N. Orange, S. Chevalier, V. Norris, C.M. Lange, Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up - to - the - Minute Research in Mass Spectrometry* 21(11) (2007) 1721-1728.
- [38] Y.Y. Chang, J.E. Cronan, Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology* 33(2) (1999) 249-259.

- [39] C.C. DiRusso, P.N. Black, Long-chain fatty acid transport in bacteria and yeast. Paradigms for defining the mechanism underlying this protein-mediated process, *Molecular and Cellular Biochemistry* 192(1-2) (1999) 41-52.
- [40] P.N. Black, Characterization of FadL-specific fatty acid binding in *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1046(1) (1990) 97-105.
- [41] N.P. Santisteban, M.R. Morrow, V. Booth, Protocols for studying the interaction of MSI-78 with the membranes of whole gram-positive and gram-negative bacteria by NMR, in: P.R. Hansen (Ed.), *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols*, Springer, New York, NY, 2017, pp. 217-230.
- [42] C. Hoek, H. Van den Hoeck, D. Mann, H. Jahns, *Algae: an introduction to phycology*, 623 pages, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- [43] M.A. Scranton, J.T. Ostrand, F.J. Fields, S.P. Mayfield, *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio - products production, *The Plant Journal* 82(3) (2015) 523-531.
- [44] I. Martín-de-Lucía, M.C. Campos-Mañas, A. Agüera, F. Leganés, F. Fernández-Piñas, R. Rosal, Combined toxicity of graphene oxide and wastewater to the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Environmental Science: Nano* 5(7) (2018) 1729-1744.
- [45] N.S. Taylor, R. Merrifield, T.D. Williams, J.K. Chipman, J.R. Lead, M.R. Viant, Molecular toxicity of cerium oxide nanoparticles to the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* is associated with supra-environmental exposure concentrations, *Nanotoxicology* 10(1) (2016) 32-41.
- [46] C. Hoek, H. Van den Hoeck, D. Mann, H. Jahns, *Algae: an introduction to phycology*, 623 pages, Cambridge university press, Cambridge, 1995.

- [47] S.H. Imam, M.J. Buchanan, H.C. Shin, W.J. Snell, The *Chlamydomonas* cell wall: characterization of the wall framework, *The Journal of Cell Biology* 101(4) (1985) 1599-1607.
- [48] A. Vieler, C. Wilhelm, R. Goss, R. Süß, J. Schiller, The lipid composition of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* investigated by MALDI-TOF MS and TLC, *Chemistry and Physics of Lipids* 150(2) (2007) 143-155.
- [49] G.O. James, C.H. Hocart, W. Hillier, H. Chen, F. Kordbacheh, G.D. Price, M.A. Djordjevic, Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation, *Bioresource technology* 102(3) (2011) 3343-3351.
- [50] R.M. Atlas, *Handbook of microbiological media*, fourth edition, 2040 pages, Taylor & Francis, Kentucky, 2010.
- [51] J.J. Cronan, C.O. Rock, Biosynthesis of membrane lipids, *EcoSal Plus* 3(1) (2008).
- [52] V. Tugarinov, V. Kanelis, L.E. Kay, Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy, *Nature Protocols* 1(2) (2006) 749-754.
- [53] T. Lewis, P.D. Nichols, T.A. McMeekin, Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs, *Journal of Microbiological Methods* 43(2) (2000) 107-116.
- [54] A.M. Burja, R.E. Armenta, H. Radianingtyas, C.J. Barrow, Evaluation of fatty acid extraction methods for *Thraustochytrium* sp. ONC-T18, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(12) (2007) 4795-4801.

- [55] K.i. Ichihara, A. Shibahara, K. Yamamoto, T. Nakayama, An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids, *Lipids* 31(5) (1996) 535-539.
- [56] H. Wang, H. Cheng, F. Wang, D. Wei, X. Wang, An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells, *Journal of Microbiological Methods* 82(3) (2010) 330-333.
- [57] A.A. Arnold, B. Genard, F. Zito, R. Tremblay, D.E. Warschawski, I. Marcotte, Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by <sup>13</sup>C solid-state NMR, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848(1, Part B) (2015) 369-377.
- [58] J. Garnier, B. Wu, M. Jeannine, D. Guyon, A. Trémolières, Restoration of both an oligomeric form of the light-harvesting antenna CP II and a fluorescence state II-state I transition by  $\Delta^3$ -trans-hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol, in cells of a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1020(2) (1990) 153-162.
- [59] A. Jamers, M. Lenjou, P. Deraedt, D.V. Bockstaele, R. Blust, W.d. Coen, Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae), *European Journal of Phycology* 44(4) (2009) 541-550.
- [60] Y. Li, F. Beisson, M. Pollard, J. Ohlrogge, Oil content of *Arabidopsis* seeds: the influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation, *Phytochemistry* 67(9) (2006) 904-915.
- [61] A. Flieger, S. Gong, M. Faigle, H.A. Mayer, U. Kehrler, J. Mußotter, P. Bartmann, B. Neumeister, Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids, *FEMS microbiology letters* 188(2) (2000) 129-133.

- [62] N.W. Lutz, P.J. Cozzone, Multiparametric optimization of  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopic analysis of phospholipids in crude tissue extracts. 1. chemical shift and signal separation, *Analytical Chemistry* 82(13) (2010) 5433-5440.
- [63] J.H. Davis, The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by  $^2\text{H}$ -NMR, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 737(1) (1983) 117-171.
- [64] J.H. Davis, Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine, *Biophysical Journal* 27(3) (1979) 339-358.
- [65] R.E. Wasylshen, S.E. Ashbrook, S. Wimperis, NMR of quadrupolar nuclei in solid materials, 584 pages, John Wiley & Sons, Edmonton, 2012.
- [66] I. Marcotte, Notes de cours - CHI-7180 - Méthodes d'analyses spectroscopiques avancés, Université du Québec à Montréal (UQAM), 2016.
- [67] R. Barnes, J. Bloom, Measurement of the quadrupole coupling constant and asymmetry parameter of the ring deuterons in several deuterated benzene derivatives, *The Journal of Chemical Physics* 57(8) (1972) 3082-3086.
- [68] M.M. Maricq, J. Waugh, NMR in rotating solids, *The Journal of Chemical Physics* 70(7) (1979) 3300-3316.
- [69] C.C. DiRusso, T. Nyström, The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates, *Molecular Microbiology* 27(1) (1998) 1-8.
- [70] R. Estrada, N. Stolowich, M.C. Yappert, Influence of temperature on  $^{31}\text{P}$  NMR chemical shifts of phospholipids and their metabolites I. In chloroform-methanol-water, *Analytical Biochemistry* 380(1) (2008) 41-50.

- [71] Z.T. Wang, N. Ullrich, S. Joo, S. Waffenschmidt, U. Goodenough, Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryotic cell* 8(12) (2009) 1856-1868.
- [72] J. Seelig, H.-U. Gally, R. Wohlgemuth, Orientation and flexibility of the choline head group in phosphatidylcholine bilayers, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 467(2) (1977) 109-119.
- [73] V. Sirisha, M. Sinha, J.S. D'Souza, Menadione - induced caspase - dependent programmed cell death in the green chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*, *Journal of Phycology* 50(3) (2014) 587-601.
- [74] N. Velmurugan, M. Sung, S.S. Yim, M.S. Park, J.W. Yang, K.J. Jeong, Evaluation of intracellular lipid bodies in *Chlamydomonas reinhardtii* strains by flow cytometry, *Bioresource Technology* 138 (2013) 30-37.
- [75] H. Farooq, D. Courtier - Murias, R. Soong, H. Masoom, W. Maas, M. Fey, R. Kumar, M. Monette, H. Stronks, M.J. Simpson, Rapid parameter optimization of low signal - to - noise samples in NMR spectroscopy using rapid CPMG pulsing during acquisition: application to recycle delays, *Magnetic Resonance in Chemistry* 51(3) (2013) 129-135.
- [76] S.H. Hutner, L. Provasoli, A. Schatz, C. Haskins, Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms, *Proceedings of the American Philosophical Society* 94(2) (1950) 152-170.
- [77] K.P. Putzer, L.A. Buchholz, M.E. Lidstrom, C.C. Remsen, Separation of Methanotrophic Bacteria by Using Percoll and Its Application to Isolation of Mixed and Pure Cultures, *Applied and Environmental Microbiology* 57(12) (1991) 3656-3659.

[78] T. Buttke, L. Ingram, Comparison of lipopolysaccharides from *Agmenellum quadruplicatum* to *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by using thin-layer chromatography, *Journal of Bacteriology* 124(3) (1975) 1566-1573.

[79] G.J. Olson, L. Ingram, Effects of temperature and nutritional changes on the fatty acids of *Agmenellum quadruplicatum*, *Journal of Bacteriology* 124(1) (1975) 373-379.