



Ecole Doctorale des  
Sciences de la Vie et de la Santé (ED n°85)

NOM et Prénom du Candidat : TIBERTI Marion .....

Date de soutenance de la Thèse : 11/12/2019

NOM et Prénom du Rapporteur : ...CALLEBAUT Isabelle.....

Avis sur la tenue de la soutenance : ☒ Favorable ☐ Défavorable

Date : 17 novembre 2019

Signature obligatoire du Rapporteur :

**Evaluation Quantitative et Qualitative de la Thèse :**

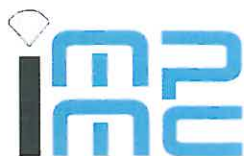
Comment se situe ce mémoire de Thèse par rapport à ceux de la même discipline que vous avez eu l'occasion d'évaluer comme rapporteur en ce qui concerne la quantité et la qualité du travail expérimental, l'originalité du projet, la prise de risque, la qualité et le nombre des publications, et la qualité du manuscrit ?

*Marion Tiberti a réalisé un travail considérable, en termes de quantité et de qualité, couplant approches théoriques et expérimentales. Ce travail a conduit à des résultats originaux et remarquables, dans un domaine compétitif, et a été valorisé par deux publications (une parue et l'autre soumise) dans des journaux à fort impact. Le manuscrit de thèse est clair et très bien rédigé.*

Pensez-vous que cette Thèse mérite de concourir pour le Prix accordé chaque année par l'ED85 à la meilleure Thèse ?

Oui

*(Joindre le rapport sur les travaux de thèse)*



Isabelle Callebaut  
Directeur de recherche au CNRS  
isabelle.callebaut@sorbonne-universite.fr

## **Rapport sur le manuscrit de thèse présenté par Marion Tiberti, intitulé « Comment les lipides polyinsaturés facilitent la déformation membranaire »**

Le manuscrit de thèse présenté par Marion Tiberti porte sur l'étude de l'impact des phospholipides polyinsaturés dans les mécanismes de déformation et de fission des membranes. Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de ceux réalisés il y a quelques années par Bruno Antonny et Romain Gautier, co-directeurs de la thèse de Marion Tiberti, qui ont montré que ces lipides rendent les membranes plus malléables et plus sensibles à l'action de protéines qui les déforment et les découpent au cours des processus d'endocytose. Les objectifs poursuivis ici par Marion Tiberti ont été de réaliser des études systématiques, en faisant appel à des simulations de dynamique moléculaire tout atome et gros grain, pour comprendre l'influence du nombre d'insaturations sur les propriétés de la membrane, ainsi que l'origine de la distribution des chaînes polyinsaturées au sein des lipides. Des questions additionnelles ont également été abordées, telles celles de l'impact, lors de la déformation, de la position des phospholipides dans les feuillettes internes ou externes, ainsi que de leur tête polaire. Marion Tiberti a également entrepris d'étudier l'impact du cholestérol sur la dynamique des phospholipides et la malléabilité des membranes. Ces travaux théoriques de grande ampleur, couplés à des approches expérimentales réalisées pour partie par Marion Tiberti, constituent une contribution importante à la compréhension des mécanismes moléculaires à l'œuvre dans les phénomènes d'endocytose rapide.

Le manuscrit de thèse est très bien rédigé et pédagogique. Il serait souhaitable pour la version finale d'apporter quelques corrections au niveau de l'orthographe et de compléter certaines références bibliographiques. Le manuscrit est construit autour de deux articles qui rassemblent une grande partie des résultats obtenus, ainsi que d'un chapitre faisant état de résultats additionnels. Cette section de résultats est précédée d'une introduction et d'un chapitre « matériel et méthodes ». Une quatrième partie conclut le manuscrit, reprenant une discussion, une conclusion et les perspectives de ce travail.

L'introduction est très claire, bien documentée et illustrée, et apporte l'information nécessaire à la compréhension des enjeux et des résultats présentés. Après un premier chapitre reprenant les caractéristiques générales des lipides membranaires, de leur synthèse et de la structure des membranes, un deuxième chapitre aborde les propriétés topologiques et physicochimiques des phospholipides polyinsaturés et de celles des membranes les incorporant, en détaillant également l'importance de leur rôle dans diverses fonctions cellulaires et dans le trafic vésiculaire. A titre personnel et bien que ce ne soit pas indispensable, j'aurais aimé avoir à ce stade un peu plus de détails sur les acteurs de l'endocytose qui ne sont présentés que très brièvement. Enfin, un dernier chapitre se focalise sur les méthodes et outils de simulation de dynamique moléculaire, décrivant leur adaptation au cas spécifique des lipides polyinsaturés et dressant l'état de l'art des apports déjà réalisés dans ce domaine grâce à ces approches. La partie « Matériel et Méthodes », portant sur les parties théoriques (simulations de dynamique moléculaire et descripteurs utilisés pour l'analyse) et expérimentales (fabrication et caractérisation de liposomes asymétriques) est elle aussi très claire et



apporte les éléments nécessaires à la compréhension des résultats présentés dans la suite du manuscrit.

La première partie des résultats correspond à un très solide article dont Marion Tiberti est second auteur, publié dans *eLife* en mars 2018. Cet article porte sur une étude réalisée de façon exhaustive afin de comprendre comment le niveau d'insaturation des phospholipides impacte les déformations membranaires. Il couple de façon très élégante approches expérimentales et théoriques, ces dernières ayant été réalisées par Marion Tiberti, en combinant simulations tout atome pour étudier la dynamique des chaînes lipidiques sur des membranes planes et simulations gros grain pour suivre la déformabilité des membranes. La partie expérimentale repose sur le suivi de liposomes pour évaluer la capacité de fission des membranes (activité GTPase traduisant l'activité de la dynamine, microscopie électronique) et la perméabilité membranaire (expériences de fluorescence). En accord avec les expériences de fluorescence, l'analyse théorique a permis de mettre en évidence une perméabilité plus grande des membranes formées de phospholipides polyinsaturés symétriques (et d'autant plus grande que le niveau d'insaturation est important) par rapport à celles formées de phospholipides polyinsaturés asymétriques, l'épaisseur des membranes étant par ailleurs réduite. Ces résultats, combinés à l'observation expérimentale d'une plus grande déformabilité, indiquent de façon très intéressante que l'abondance naturelle de lipides associant une chaîne saturée en sn1 et une chaîne polyinsaturée en sn2 permet d'assurer la malléabilité nécessaire aux processus de déformation et de vésiculation tout en contrôlant la perméabilité. L'analyse théorique de la déformabilité de la membrane et de la dynamique des phospholipides au moyen de différents descripteurs a également montré que les insaturations apportent une flexibilité en permettant des mouvements verticaux, rendant ainsi la membrane plus malléable. De façon très intéressante également, des simulations complémentaires ont également permis de comprendre les préférences de positions (sn2 versus sn1) de la polyinsaturation. Ces résultats remarquables permettent de donner une explication rationnelle, à l'échelle atomique, du rôle des lipides polyinsaturés au niveau de la dynamique des membranes cellulaires.

La deuxième partie du travail est présentée sous la forme d'un manuscrit soumis pour publication à un numéro spécial du journal *Soft Matter* et adresse de façon théorique la question de l'asymétrie des membranes vis à vis des phospholipides polyinsaturés. Des compositions de membranes asymétriques (monoinsaturation versus polyinsaturation en position sn2) ont été étudiées par simulation gros grain en appliquant une force constante au centre de la membrane pour évaluer l'impact de la polyinsaturation sur la déformation membranaire en courbure positive et négative et en prenant en compte l'effet de différentes têtes polaires. Les conclusions qui découlent de l'analyse de ces simulations indiquent que les lipides polyinsaturés influent sur la déformation membranaire lorsque présents à la surface convexe, externe, des tubes formés (correspondant à la couche cytosolique), avec peu d'influence de la tête polaire. Une analyse de la géométrie des chaînes indique qu'ils adaptent leurs formes à la courbure de la membrane. A nouveau, ces résultats permettent de donner une explication rationnelle, à l'échelle atomique, de l'asymétrie observée dans les membranes cellulaires. Marion Tiberti présente également ici les travaux qu'elle a entrepris pour préparer des liposomes asymétriques afin de valider ses résultats théoriques, mettant ainsi en lumière les raisons pour lesquelles cette partie expérimentale particulièrement ardue n'a pas pu aboutir.

Le dernier chapitre des résultats est consacré à l'étude des relations entre cholestérol et lipides polyinsaturés, deux espèces aux propriétés distinctes mais présentes en abondance au niveau des membranes synaptiques. Des simulations tout atomes et gros grain de membranes ont été ainsi réalisées pour étudier l'influence du cholestérol sur la dynamique des phospholipides et sur la malléabilité de la membrane, ainsi que l'influence des phospholipides polyinsaturés sur la conformation et l'orientation du cholestérol dans la membrane. Cette partie du travail, bien que concernant des résultats qu'il convient d'approfondir et de confronter plus avant avec des données

expérimentales, ouvre des perspectives importantes pour les futurs travaux de l'équipe. On notera également que Marion Tiberti a participé au développement d'un outil de caractérisation de défauts de packing, qui a également fait l'objet d'une publication.

Le manuscrit de thèse se termine par un chapitre d'une dizaine de pages qui reprend les grandes conclusions du travail de Marion Tiberti, et fournit une discussion bien argumentée, mettant en lumière les limitations actuelles du travail réalisé et les moyens de les dépasser. J'ai trouvé ce chapitre particulièrement intéressant, incluant des questions pertinentes et des prises de perspective logiques, témoignant du recul et de la maturité acquise par la candidate vis-à-vis de questions complexes.

En résumé, Marion Tiberti a réalisé un travail considérable, rigoureux et complet, qui a fait significativement avancer la compréhension des mécanismes moléculaires à l'œuvre lors des mécanismes d'endocytose rapide. Lors de ce travail, elle a acquis une large expertise tant théorique que pratique portant non seulement sur les simulations de dynamique moléculaire, mais aussi sur des approches expérimentales. Cette capacité à intégrer des notions et concepts de deux champs d'investigation distincts témoigne à l'évidence d'un esprit ouvert et curieux. Le manuscrit démontre bien la maîtrise acquise par la candidate sur son sujet et sur son contexte, ainsi que sur les méthodes et techniques utilisées.

C'est donc sans aucune réserve que je donne un avis très favorable à la soutenance de la thèse de doctorat de Marion Tiberti.



Fait à Paris, le 17 novembre 2019





Ecole Doctorale des  
Sciences de la Vie et de la Santé (ED n°85)

NOM et Prénom du Candidat : TIBERTI Marion.....

Date de soutenance de la Thèse : 11/12/2019 .....

NOM et Prénom du Rapporteur : BAADEN Marc.....

Avis sur la tenue de la soutenance :                      \* **Favorable**                      ☐ Défavorable

Date : 20.11.2019

Signature obligatoire du Rapporteur :

**Evaluation Quantitative et Qualitative de la Thèse :**

Comment se situe ce mémoire de Thèse par rapport à ceux de la même discipline que vous avez eu l'occasion d'évaluer comme rapporteur en ce qui concerne la quantité et la qualité du travail expérimental, l'originalité du projet, la prise de risque, la qualité et le nombre des publications, et la qualité du manuscrit ?

Le travail est plus que satisfaisant en terme de qualité et quantité des simulations effectuées, l'originalité de l'approche et le lien fort avec l'expérience est à souligner. Il y a une prise de risque mesurée. Le travail a mené à une publication dans eLife et une autre soumise à Soft Matter, deux bons journaux de la discipline. La qualité du manuscrit est tout à fait excellente (mis à part quelques erreurs d'orthographe).

Pensez-vous que cette Thèse mérite de concourir pour le Prix accordé chaque année par l'ED85 à la meilleure Thèse ?

Ne connaissant pas le niveau de compétition à l'ED85 pour ce Prix, il m'est difficile de répondre avec précision, mais intrinsèquement je situerai ce travail à un très bon niveau des thèses que j'ai l'habitude d'évaluer, sans aucun doute dans le dernier quartile.

***(Joindre le rapport sur les travaux de thèse)***

A l'attention de

**Secrétariat**

ED des Sciences de la Vie et de la Santé

Université Côte d'Azur

## **Rapport sur la thèse de doctorat**

De

Madame Marion TIBERTI, Université Côte d'Azur

portant sur le sujet "*Comment les lipides polyinsaturés facilitent les déformations membranaires*".

Le travail a été effectué sous la co-direction du Dr. Bruno Antonny et le Dr. Romain GAUTIER

## **Résumé**

Dans son manuscrit de thèse de doctorat, Madame Marion TIBERTI présente une étude approfondie et originale de la caractérisation de l'effet de phospholipides polyinsaturés sur la déformation et fission des membranes, notamment par les protéines de l'endocytose. Cette étude focalise sur l'apport de la simulation numérique, caractérisant des éléments saillants du processus de l'enrichissement de ces lipides dans les membranes plasmiques neuronales à travers une étude de membranes modèles. A la base de ces travaux se trouve le contrôle de la distribution des chaînes polyinsaturées lors de simulations de dynamique moléculaire ciblées. Le but de ces simulations est d'abord d'introduire un nombre croissant d'insaturations, puis d'imposer une asymétrie de composition des deux feuillets de la membrane. La présentation est structurée et progressive, en démarrant par une modification systématique augmentant l'insaturation sur les chaînes en position 1 et/ou 2. Cette caractérisation est suivie par une étude limitant les insaturations à un seul feuillet de la membrane, mimant

l'asymétrie de composition entre feuillet. La candidate fait preuve de systématique en traitant ces aspects dans un ordre de complexité croissante. Elle apporte de précieux éléments pour alimenter la réflexion avec un souci de rationaliser les phénomènes complexes sous-jacents. Il s'agit notamment de caractériser les mouvements verticaux des chaînes aliphatiques, l'effet mécanique engendré, la relation entre imperméabilité et flexibilité membranaire et la déformation, voire fission, de la membrane. L'ensemble du manuscrit est bien rédigé, riche en informations et représente un effort de mise en contexte de la littérature sur le sujet. Ce travail aborde de manière originale le problème difficile du lien entre la courbure membranaire et la présence de chaînes polyinsaturées, un problème clé pour améliorer notre compréhension des membranes cellulaires.

## **Évaluation du travail présenté dans la thèse par chapitre**

**Chapitre I (Introduction)** - Ce chapitre introduit de manière approfondie le contexte de l'étude et résume dans sa première partie une série d'aspects relatifs aux membranes biologiques de manière générale, concernant leur découverte, les types de lipides majeurs, leur synthèse, l'incorporation des acides gras et la structure de la membrane. Le fil rouge qui traverse ce chapitre concerne la polyinsaturation des phospholipides et notre état de connaissance en tant que propriété physico-chimique pour guider une réflexion sur des questions de santé, de fonctions cellulaires ou encore du trafic vésiculaire. Une analyse à l'échelle atomique est mise en avant à travers la dynamique moléculaire. Ces méthodes numériques et leur application pour caractériser les polyinsaturés sont présentées sous un angle tout à fait intéressant. Les objectifs de la thèse avec ses différents axes sont énoncés. Cette introduction générale présente une agréable entrée en la matière décrite dans la thèse et est richement illustrée.

**Chapitre II (Matériels et Méthodes)** - Ce chapitre reprend un peu plus en détail la méthode des simulations de dynamique moléculaire aux niveaux tout atome et gros grain. Les méthodes d'analyse sont introduites pour caractériser défauts de packing et déformabilité des membranes ainsi que les aspects dynamiques. Ces simulations de dynamique moléculaire permettent de renseigner sur la structure et la dynamique des membranes de différentes compositions et de différentes symétries entre feuillet. La croissance de tubes membranaires dans les systèmes gros grain est décrite. Le troisième volet concerne en particulier les liposomes asymétriques, de la conception de ces objets qui peuvent être symétriques ou asymétriques à la validation de l'asymétrie et de l'intégrité. L'activité dynamine/endophiline est également discutée dans ce contexte. Ce chapitre – même s'il est relativement concis et n'explicite pas forcément tous les choix sous-jacents – apporte les fondements nécessaires à partir desquels les résultats de la thèse pourront être construits, ce qui est décrit dans le chapitre suivant en particulier.

**Chapitre III (Résultats : l'asymétrie pour atteindre l'équilibre)** - Une suite logique du précédent chapitre consiste à étudier trois aspects complémentaires: l'asymétrie des phospholipides eux-mêmes, l'asymétrie qui s'opère au niveau des membranes et le lien particulier entre le cholestérol et les chaînes polyinsaturées. Il s'agit de manière systématique d'études numériques, complétées par des expériences en fonction de leur faisabilité. Dans un premier temps symétrie *vs* asymétrie des phospholipides est traitée en investiguant l'impact du niveau d'insaturation dans le cadre d'une étude où l'asymétrie est contrôlée. Ce travail est publié dans la revue eLife. En rappelant le

contexte biologique, l'impact de la répartition asymétrique au sein d'une bicouche est décrit avec en particulier l'effet des têtes polaires. Un thème majeur concerne l'adaptation de la conformation des phospholipides aux courbures positives et la difficulté de la validation expérimentale de ces phénomènes. Un deuxième article correspondant à ce volet est soumis au journal *Soft Matter*. L'influence du cholestérol sur la dynamique membranaire, et en particulier les chaînes aliphatiques polyinsaturées forment le dernier volet des résultats discutés. La perspective concerne en particulier la déformation membranaire induite par le cholestérol.

Ces études mènent à plusieurs résultats importants. Concernant la flexibilité des membranes qui se manifeste par des mouvements verticaux des chaînes aliphatiques, le niveau de polyinsaturation est corrélé et à l'origine de cette observation. Ce sont notamment la différence entre les chaînes omega-6 et omega-3 et l'augmentation du nombre d'insaturations qui induisent des effets mécaniques croissants. L'équilibre entre chaînes aliphatiques saturées et polyinsaturées dans les phospholipides mène à un compromis entre imperméabilité et flexibilité membranaires. La présence de phospholipides polyinsaturés dans le feuillet "externe" (par rapport à la déformation) stimule la déformation et la fission de la membrane. Dans le modèle, leur conformation s'adapte à la courbure, en cohérence avec des observations pour les membranes cellulaires.

**Chapitre IV (Discussion, conclusion et perspectives)** - Dans ce chapitre final, l'auteure met en lumière les travaux présentés jusqu'ici dans ce mémoire, en concluant notamment sur l'apport de la méthodologie proposée pour caractériser et prédire les effets des différents niveaux d'asymétrie, puis ouvre quelques perspectives vers des évolutions futures de cette approche. La discussion sur les limites des simulations est tout à fait appréciable. La conclusion résume et retrace fidèlement le cheminement de la thèse.

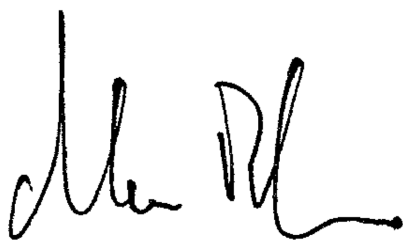
## Avis

Dans son manuscrit, Marion TIBERTI présente un ensemble d'approches de dynamique moléculaire tout atome et gros grain pour caractériser l'effet des (poly)insaturations et leur présence symétrique/asymétrique au niveau des chaînes sn1/sn2 des phospholipides, voir des deux feuillets des bicouches lipidiques, sur les propriétés de ces membranes. L'ensemble du manuscrit est agréable à lire, tout en se situant à un niveau de discussion avancée. Seules les erreurs d'orthographe freinent quelque peu la lecture. Comme c'est souvent le cas avec des travaux de recherche sur un sujet complexe, on n'obtient pas forcément toutes les réponses concluantes sur toutes les questions posées, mais plusieurs apports sont significatifs. L'effort continu de mettre en face les résultats (voir prédictions) des simulations aux validations expérimentales doit être souligné. Il s'agit d'un travail soigné et conséquent. Cette étude aborde le sujet de manière originale, tout en montrant une compréhension des diverses techniques théoriques utilisées, ainsi qu'une bonne connaissance de la littérature.

En conclusion, je recommande sans réserve que Madame Marion TIBERTI soit autorisée à défendre son mémoire en soutenance publique afin d'obtenir le titre de Docteur es Sciences. La thèse peut être soutenue en l'état.



Fait à Paris, le 20 novembre 2019

A handwritten signature in black ink, consisting of two parts: a cursive 'M' followed by a stylized 'Baaden'.

Le rapporteur

Dr M. Baaden

Directeur de recherche au CNRS / HDR