

Etude et ingénierie de la N-glycosylation des protéines chez la microalgue verte chlamydomanas reinhardtii.

Pierre-Louis Lucas

▶ **To cite this version:**

Pierre-Louis Lucas. Etude et ingénierie de la N-glycosylation des protéines chez la microalgue verte chlamydomanas reinhardtii.. Microbiologie et Parasitologie. Normandie Université, 2019. Français. ⟨NNT : 2019NORMR061⟩. ⟨tel-02389060⟩

HAL Id: tel-02389060

https://theses.hal.science/tel-02389060v1

Submitted on 2 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie,
Laboratoire Glyco-MEV EA 4358

Etude et ingénierie de la *N*-glycosylation des protéines chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*

Présentée et soutenue par
Pierre-Louis LUCAS

Thèse soutenue publiquement le 11 Septembre 2019 devant le jury composé de		
Mr Gilles PELTIER	Chercheur CEA-HDR, Laboratoire de bioénergétique et biotechnologie des bactéries et microalgues, CEA de Cadarache, Saint Paul Lez Durance	Rapporteur
Mr Richard DANIELLOU	Professeur, Institut de Chimie Organique Analytique UMR7311, Université d'Orléans	Rapporteur
Mme Christelle BRETON	Professeur, Glycobiologie moléculaire et structurale, CERMAV-CNRS, Université Grenoble Alpes	Examinateur
Mr Jean-François SASSI	Ingénieur-Chercheur CEA, CEA de Cadarache, Saint Paul Lez Durance	Examinateur
Mme Corinne LOUTELIER-BOURHIS	Maître de conférences, Chimie Organique et Bioorganique : Réactivité et Analyse, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Mr Patrice LEROUGE	Professeur, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire végétale EA 4358, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Mme Narimane MATI-BAOUCHE	Maître de conférences, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire végétale EA 4358, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Mme Muriel BARDOR	Professeur, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire végétale EA 4358, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Mme Muriel BARDOR, Professeur, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire végétale EA 4358, Université de Rouen Normandie

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

GLYCO MEV
EA 4358

THESE

Étude et ingénierie de la *N*-glycosylation des protéines chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*

Remerciements

Je souhaite, tout d'abord, remercier Mr Richard Daniellou, Professeur à l'Université d'Orléans, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse.

Merci à Mr Gilles Peltier, Chercheur au CEA de Cadarache, d'avoir accepté d'être mon second rapporteur. Merci de m'avoir accepté au sein de votre unité lors de mon premier stage dans le monde de la recherche. Votre présence dans ce jury me tenait vraiment à cœur.

Je remercie Mme Christelle Breton, Professeur à l'Université de Grenoble, et Mr Jean-François Sassi, Chercheur au CEA de Cadarache, d'avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse.

Un grand merci à Mme Corinne Loutelier-Bourhis, Maître de conférences à l'Université de Rouen Normandie, pour sa participation active dans ma thèse. Je te remercie pour ton dynamisme et ta réactivité, j'ai grâce à toi beaucoup appris en spectrométrie de masse. Ce fût un réel plaisir de travailler en collaboration avec toi.

Je remercie Mr Patrice Lerouge, Professeur à l'Université de Rouen Normandie d'avoir bien voulu être examinateur de mes travaux de thèse. Je lui suis également reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire lors de mon stage de Master 2, ainsi que pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités scientifiques, sa franchise et sa sympathie.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse Mme Muriel Bardor, Professeur à l'Université de Rouen Normandie. Pour la confiance que vous m'avez accordé depuis le Master 2. Pour votre attention de tout instant sur mes travaux, pour vos conseils avisés et votre écoute qui ont été des éléments moteurs pour moi. Votre énergie et votre disponibilité à toute heure, parfois très tard la nuit ou très tôt le matin, ont été prépondérantes pour la bonne réussite de cette thèse. J'ai pris un immense plaisir à travailler avec vous au long de ces trois années de thèse.

Je remercie infiniment Mme Narimane Mati-Baouche, Maitre de conférences à l'Université de Rouen Normandie, ayant co-encadré ma thèse à partir de ma deuxième année. Ton aide et tes conseils ont été précieux pour moi. Merci pour ta bonne humeur et ton écoute

qui ont su me rassurer et me redonner confiance dans les moments difficiles. J'ai beaucoup apprécié travailler en ta compagnie.

Un grand merci à Mme Elodie Mathieu-Rivet, Maître de conférences à l'Université de Rouen. Merci pour ton aide au cours de ma thèse, plus particulièrement pour ton implication en biologie moléculaire.

Merci beaucoup à Mr Phillippe Chan, de la plateforme PISSARO, pour son investissement tout au long de ma thèse lors de l'analyse des glycannes.

Je tiens également à remercier Mr Michael Hippler, Professeur à l'Université de Münster en Allemagne, et Anne Oltmanns, Doctorante à l'Université de Münster, pour m'avoir accueilli au sein de leur institut pendant 2 mois afin de réaliser les croisements cellulaires de Chlamy.

Merci à Carole Plasson et Carole Burel, m'ayant fourni une aide très précieuse dans de nombreuses manipulations. Je vous dois beaucoup.

Je remercie tous les membres de mon comité de suivi de thèse, Mme Hélène Tubeuf, Mr Yann Guérardel, Mr David Dauvillée et Mr Pascal Favrel, pour avoir bien voulu me suivre au long de cette aventure et avoir su me donner des conseils.

Je remercie tous les membres du laboratoire Glyco-MEV, ces trois années en votre présence se sont déroulées dans la joie et la bonne humeur. Merci pour tous ces moments de convivialités et pour toutes ces discussions.

Merci à tous mes chers camarades doctorants du Glyco-MEV, cette thèse aurait été bien moins amusante sans votre compagnie. Que ce soit au laboratoire, ou au Colbert, réel QG des Doctorants.

Je tiens, tout particulièrement, à remercier mes camarades de bureau. Merci à Jeremy Dehors avec lequel cette thèse a également été riche en progrès sportif et culture cinématographique. Merci à Rodolphe Dumontier, soutien footballistique du laboratoire et spécialiste de la Pavard. Merci à Coralie Chuberre qui, bien que bretonne, était dotée d'un réel sens de l'humour.

Un grand merci également à Aline Planchon, Marc Ropitaux et Mathilde Camiade pour votre sagesse et ces bons moments passés ensemble souvent près d'une bière. Merci à Marie Chambard grand fléau de mon bureau. Merci également à Charlotte Toustou d'avoir été une collègue très agréable.

Je n'oublie pas de remercier tous les post-doctorants, stagiaires et anciens du laboratoire. Soyez sûr que je garderai en mémoire un très bon souvenir de vous.

Finalement, je tiens à remercier ma famille et mes amis, qui ont su me soutenir et me supporter au long de cette étape de ma vie. Je remercie particulièrement mes parents, qui ont toujours cru en moi depuis le début. Merci de m'avoir toujours encouragé à aller de l'avant que ce soit dans les études comme dans la vie.

Sommaire

Remerciements 3

Sommaire 7

Liste des abréviations 12

Liste des figures 22

Liste des tableaux 24

Présentation du candidat 25

Introduction 31

I) Production de protéines recombinantes 33

A) Généralités sur les biomédicaments 33

B) Notion de protéines recombinantes 33

1) Hormones 35
2) Cytokines 35
3) Enzymes 35
4) Anticorps monoclonaux 36
5) Vaccins 36

C) Importance des modifications post-traductionnelles 37

II) Différents systèmes de production 38

A) Cellules de mammifères 38

B) Levures 40

C) Plantes 41

III) Les voies de la *N*-glycosylation 42

A) Synthèse du précurseur oligosaccharidique 43

1) Synthèse cytosolique 43
2) Synthèse luminale 46
3) Oligosaccharyltransférase (OST) 47
4) Contrôle qualité 48

B) Modifications dans l'appareil de Golgi 50

1) *N*-glycannes de mammifères 51
2) *N*-glycannes de levures 53
3) *N*-glycannes de plantes 55

C) Autres formes de N-glycosylation : les parasites 58

D) Transporteurs de nucléotides-sucres 59

IV) *O*-Glycosylation des protéines 60

A) O-glycosylation chez les mammifères 60

1) *O*-glycannes de type Mucine 61

B) O-glycosylation chez les plantes 62

1) *O*-glycosylation des AGPs 63
2) *O*-glycosylation des EXTs 63

V) Ingénierie des voies de *N*-glycosylation 65

A) Ingénierie de la glycosylation chez les cellules de mammifères *65*
1) Retrait des épitopes immunogènes 65
2) Amélioration de la sialylation 66
3) Utilisation de mutants de glycosylation 67

B) Ingénierie de la N-glycosylation chez les levures *68*
1) Arrêt des voies d'hypermannosylation 68
a) Mutation des enzymes de l'hypermannosylation 68
b) Mutation sur le précurseur du RE 69
2) Ajout d'enzymes d'humanisation des glycannes 69

C) Ingénierie de la N-glycosylation chez les plantes *72*
1) Retrait des épitopes de plantes (xylose et fucose) 72
a) Signal de rétention dans le RE 72
b) Utilisation de mutants de glycosylation 73
c) Inactivation des xylosyltransférases et fucosyltransférases par siRNA 73
d) Retrait des fucoses et xyloses par édition génétique 74
2) Ajout d'enzymes d'humanisation chez les plantes 74
a) Galactosylation des glycannes de plantes 74
b) Formation de glycannes tri- et tetra-antennés 75
c) Sialylation des glycannes de plantes 75

VI) Les microalgues : nouvelles alternatives pour la production de protéines recombinantes 78

A) Généralités sur les microalgues *78*
1) Chlamydomonas reinhardtii 79
2) *Phaeodactylum tricornutum* 81

B) Production de molécules à intérêt thérapeutiques chez les microalgues *82*
1) Chlamydomonas reinhardtii 82
2) Phaeodactylum tricornutum 84

C) Glycosylation des microalgues *84*
1) Formation du précurseur glycannique dans le RE 85
a) C. reinhardtii 85
b) P. tricornutum 85
2) Formation des *N*-glycannes complexes dans l'appareil de Golgi 86
a) C. reinhardtii 86
b) P. tricornutum 87
c) Autres microalgues 88
3) *O*-glycosylation chez les microalgues 89

VII) Objectifs de la thèse 90

A) Complémentation avec des glycosyltranférases hétérologues *90*

B) Utilisation de mutants de la N-glycosylation *91*

Chapitre I : 93

Réévaluation de la voie de *N*-glycosylation de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* suite à une tentative d'humanisation par expression hétérologue de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I). 93

Figures supplémentaires du chapitre I 109

Chapitre II : 119

Etude des précurseurs oligosaccharidiques liés au dolichol par spectrométrie de masse chez les microalgues, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornutum*. 119

Figures supplémentaires du chapitre II 137

Chapitre III : 143

Caractérisation de la xylosylation des *N*-glycannes chez *Chlamydomonas reinhardtii* par des approches multiples de spectrométrie de masse sur des mutants d'insertion.....143

Figures supplémentaires du chapitre III 183

Matériels et Méthodes 195

I) Matériel biologique 197

A) Chlamydomonas reinhardtii.....197
1) Souches sauvages 197
a) CC-503 cw92 mt+.....197
b) CC-5325 (CC-4533) cw15 mt-.....197
c) CC-5155 cw15 mt+.....197
2) Mutants : 198
a) Mutant XTA (LMJ.RY0402.087519).....198
b) Mutant XTB (LMJ.RY0402.118417).....198

B) Phaeodactylum tricornutum 199
1) Pt1.8.6 (CCAP1055/1) 199

C) Souches bactériennes.....199
1) DH5alpha 199
2) PIR1..... 199

II) Cultures cellulaires 199

A) Culture cellulaire de microalgues.....199
1) *C. reinhardtii* 199
2) *P. tricornutum*..... 200

B) Culture cellulaire de bactéries.....201

C) Croisement génétique de souches chez C. reinhardtii.....202
1) Croisement 202
2) Extraction des tétrades..... 203

III) Analyses biochimiques 204

A) Extraction des oligosaccharides-PP-Dolichol (LLO) 204
1) Extraction microsomale..... 204
a) C. reinhardtii 204
b) P. tricornutum.....205
2) Extraction bi-phasique des LLO 205
3) Hydrolyse acide 206
4) Perméthylation..... 207
5) Purification sur colonne C18..... 207

B) Western Blot 208
1) Extraction des protéines totales..... 208
2) Extraction des fractions enrichies en microsomes 208
3) Migration sur gel d'électrophorèse 209
4) Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose 210
5) Vérification de la qualité de transfert des protéines au rouge Ponceau 211
6) Saturation de la membrane de nitrocellulose 211
7) Marquage à l'anticorps primaire 211
8) Marquage à l'anticorps secondaire 212
9) Réactif de chimioluminescence PICO-plus 212

10) Révélation en chambre noire 212

C) Extraction des N-glycannes à la PNGase F 212
1) Extraction des protéines totales 212
2) Clivage des *N*-glycannes à la PNGase F 212
3) Précipitation éthanolique des protéines 213
4) Purification des *N*-glycannes sur colonne carbograph 214

D) Extraction des N-glycannes à la PNGase A 214
1) Extraction des protéines totales 214
2) Séparation des protéines totales sur gel d'électrophorèse 214
3) Coloration R250, décoloration 214
4) Excision des protéines 214
5) Réduction des ponts di-sulfures 215
6) Alkylation des cystéines à l'iodoacétamide (IAA) 215
7) Digestion à la trypsine 215
8) Digestion à la chymotrypsine 215
9) Extraction des glycopeptides 216
10) Clivage des *N*-glycannes à la PNGase A 216
11) Purification des *N*-glycannes digérés avec la PNGase A 217

E) Marquage des N-glycannes à un fluorophore 217
1) Marquage au 2-Aminobenzamide (2-AB) 217
2) Marquage à la procaïnamide (PROC) 218
3) Purification des glycannes marqués à un fluorophore sur colonne D1 Ludger 218
4) Purification des glycannes marqués à un fluorophore sur colonne S Ludger 218

F) Traitement enzymatique des N-glycannes 219
1) Traitement à l'α(1,2)-mannosidase 219
2) Digestion à l'α-mannosidase (Jack bean) 219

IV) Analyses par spectrométrie de masse 220

A) Analyse par MALDI-TOF-MS 220
1) Oligosaccharide précurseur 220

B) Analyse par nanoLC-ESI-MS 220
1) Oligosaccharide précurseur 220
2) Glycannes marqués à un Fluorophore 221

C) Analyse par ESI-MS^n 221

D) Analyse en ESI-IMS-MS^2 222

V) Biologie moléculaire 223

A) Extraction des acides nucléiques 223
1) Extraction ADN de *C. reinhardtii* 223
2) Extraction ARN de *C. reinhardtii* 223
3) Transcription inverse (RT) 224

B) Réaction par polymérase en chaîne (PCR) 224

C) Électrophorèse des acides nucléiques 227
1) Électrophorèse des acides nucléiques 227

D) Vérification d'insertion de la cassette CIB1 des mutants 227
1) Vérification de la mutation 227
2) Vérification du site d'insertion 228

E) Préparation des plasmides de transformation de la microalgue C. reinhardtii 229
1) Synthèse de séquence d'intérêts 229
a) Séquence optimisée TbGT11 avec Tag-V5 en rouge 231

b) Séquence optimisée TbGT15 avec Tag-HA (rouge) 231
c) Séquence optimisée AsMan avec Tag-c-Myc (rose) et peptide signal HDEL (jaune) 231
d) Séquence TrMan optimisée avec Tag-c-Myc (rose) et peptide signal HDEL (jaune) 232
2) Clonage des séquences dans le vecteur Puc57 232
3) Digestion par enzyme de restriction des plasmides 232
4) Ligation au vecteur d'expression Pks RBCS2/HSP70A-Lox 233
5) Recombinaison Cre/Lox 234

F) Transformations 239
1) Transformation de bactéries thermocompétentes DH5α 239
2) Transformation de plasmide dans la bactérie PIR1 239
3) Transformation nucléaire de *C. reinhardtii* 240

Conclusions et perspectives 241

I) Conclusions 243

A) Réévaluation de la voie de N-glycosylation de la microalgue Chlamydomonas reinhardtii suite à une tentative d'humanisation par expression hétérologue de la N-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I). 244

B) Etude des précurseurs oligosaccharidiques liés au dolichol par spectrométrie de masse chez les microalgues, Chlamydomonas reinhardtii et Phaeodactylum tricornutum. 247

C) Chapitre III : Caractérisation de la xylosylation des N-glycannes chez Chlamydomonas reinhardtii par des approches multiples de spectrométrie de masse sur des mutants d'insertion. 249

I) Perspectives 251

Bibliographie 255

Annexes 275

Liste des abréviations

µL : micro Litre

µM : micro Molaire

µmol : micro Mole

2-AB : 2-Aminobenzamide

ACTH : Adrénocorticotrophine

***A. thaliana* :** *Arabidopsis thaliana*

***A. saitoi* :** *Aspergillus saitoi*

ADCC : “Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity”

ADN/DNA : Acide Désoxyribonucléique/ “Desoxyribonucleic Acid”

ADNc/cDNA: ADN complémentaire/ ‘’complementary DNA’’

AGP : "Arabinogalactan Protein"

Ala (A) : Alanine

ALG : ”Asparagine Linked Glycosylation”

APS : Persulfate d'Ammonium

ARN/RNA : Acide Ribonucléique/ “Ribonucleic Acid”

Arg (R) : Arginine

Asn (N) : Asparagine

Asp (D) : Acide Aspartique

ATP : Adénine Triphosphate

BFA : Brefeldin A

BHK : “Baby Human Kidney”

BSA : “Bovine Serum Albumin”

$CaCl_2$: Chlorure de Calcium

C. reinhardtii : *Chlamydomonas reinhardtii*

CHO : “Chinese Hamster Ovary”

CIB1 : Cassette d’insertion avec résistance à la paromomycine

CID : “Collision Induced Dissociation”

CLiP : “Chlamydomonas Library Project”

CMP : Cytosine Monophosphate

CNX : Calnexine

$CoCl_2$: Chlorure de Cobalt

CRT : Calréticuline

CSS : CMP-Acide Sialique Synthase

CST : Transporteur de CMP-Acide Sialique

CTP : Cytosine Triphosphate

$CuSO_4$: Sulfate de Cuivre

Cys : Cystéine

Da : Dalton

DHB : Acide 2,5-DiHydroxyBenzoique

DHDDS : Dehydrodolichyl Diphosphate Synthase

DK : Dolichol Kinase

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

Dol : Dolichol

Dol-P : Dolichol Phosphate

Dol-PP : Dolichol PyroPhosphate

DTT : DiThioThréitol

ECL : ElectroChimioLuminescence

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EPO : Erythropoïétine

ERAD : ''Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation''

ESI : ''ElectroSpray Ionisation''

eV : electron Volt

ExAD : Extensin Arabinose Deficient

EXT : Extensine

Fab : Fragment antigen-binding

Fc : Fragment crystallizable

FDA : Food and Drugs Administration

$FeCl_3$: Chlorure de Fer

$FeSO_4$: Sulfate de Fer

FPP: Farnésyl PyroPhosphate

Fuc : Fucose

FucT/FuT : Fucosyltransférase

GalNAc : *N*-acétylgalactosamine

GalT : Galactosyltransférase

GDP : Guanosine Diphosphate

GFT : "GDP-fucose Transporter"

Glc : Glucose

GlcA : Acide Glucuronique

GlcNAc : *N*-acétylglucosamine

GlcNAcase : *N*-acétylglucosaminidase

Glu (U) : glutamate

Gln (Q) : Glutamine

Gly (G) : Glycine

GMT : ''GDP-mannose Transporter''

GNE : UDP-*N*-acétylglucosamine-2-Epimerase/*N*-acétylmannosamine Kinase

GnT (I-V) : *N*-acétylglucosaminyltransférase (I-V)

GRAS : "Generally Recognized As Safe"

GS (I, II) : Glucosidase (I, II)

GTP : Guanine Triphosphate

H_2O : Eau

H_3BO_3 : Acide Borique

HA : "Human influenza hemagglutinin"

HCl : Acide chlorhydrique

HEK : "Human Embryon Kidney"

HEXO : Hexosaminidase

Hg : Mercure

His (H) : Histidine

HPLC : “High Pressure Liquid Chromatography”

HRGP : “Hydroxyproline Rich Glycoprotein”

HRP: Horseradish Peroxydase

HSP70A : “Heat Shock Protein 70A”

Hyp : Hydroxyproline

Hz : Hertz

IAA : IodoAcétAmide

ICC : “Ion Charge Control”

IgG: Immunoglobuline G

Ile (I) : Isoleucine

IM : “Insertional Mutant”

IMS : “Ion-Mobility Spectrometry”

INTER : Phase Intermédiaire

IPP : IsopenténYl PyroPhosphate

KCl : Chlorure de Potassium

K_2HPO_4 : HydrogénoPhosphate de Potassium

kDa : Kilo Dalton

KH_2PO_4 : Phosphate de Potassium Monobasique

LB: “Lysogeny Broth”

LC : “Liquid Chromatography”

LDS : Lithium Dodecyl Sulfate

Leu (L) : Leucine

LLO : “Lipid Linked Oligosaccharide”

LOW : Phase inférieure

Lys (K) : Lysine

M-Pol : Mannane Polymerase

mAb : “Monoclonal Antibody”

Man : Mannose

Man I/α-Man I : α-Mannosidase I

ManNAc : *N*-acétylmannosamine

Me : Méthyle

Met (M) : Méthionine

MeT/MethylT : Méthyltransférase

$MgSO_4$: Sulfate de Magnésium

mL : milli Litre

mM : milli Molaire

$MnCl_2$: Chlorure de Manganèse

Mnn1p: α(1,3)-mannosyltransférase

Mnn2p/Mnn5p : α(1,2)-mannosyltransférase

Mnn4p/Mnn6: Mannosylphosphate Transferase

MOPS : Acide 3-Morpholino-1-Propane Sulfonique

MS : “Mass Spectrometry”

mV : milli Volt

m/z : Rapport masse/ charge

N_2 : Diazote

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NaH_2PO_4 : DihydrogénoPhosphate de Sodium

$NaNO_3$: Nitrate de Sodium

NaOH : Hydroxyde de Sodium

Neu5Ac : Acide *N*-acétylneuraminique

Neu5Gc : Acide *N*-glycolylneuraminique

NGT : ''UDP-GlcNAc Transportor''

$(NH_4)_6Mo_7O_{24,4}H_2O$: Ammonium Molybdate Tetrahydrate

NH_4Cl : Chlorure d'Ammonium

NH_4HCO_3 : Bicarbonate d'Ammonium

NST : "Nucleotid Sugar Transporter"

Och1p : α(1,6)-mannosyltransférase

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

OST : OligoSaccharylTransférase

pb/bp : paire de base/ base pair

P4H : Proline Hydroxylase

P. pastoris : *Pichia pastoris*

P. tricornutum : *Phaeodactylum tricornutum*

PAF : ParaFormAldéhyde

PCR : ''Polymerase Chain Reaction''

PEG : Poly Ethylène Glycol

Pg : Pico gramme

Pgl : ''Protein glycosylation locus''

Phe (F) : Phénylalanine

PNGase : Peptide *N*-glycosidase

PMSF : Fluorure de PhénylMéthylSulfonyle

Poly-PP : Polyprényl Pyrophosphate

Poly-Sia : Acides Poly-Sialiques

ppGaNTase : Polypeptide *N*-acétylglucosaminyltransférase

Pro (P) : Proline

Proc : Procaïnamide

PTM : ''Post-Translational Modification''

PVPP : Poly Vinyl Poly Pyrrolidone

QIT : ''Quadrupole Ion Trap''

QTOF : ''Quantitative Time Of Flight''

RBCS2 : "Ribulose Bisphosphate Carboxylase Small Chain 2"

RE/ER : Réticulum Endoplasmique/ ''Endoplasmic Reticulum''

RFT1: Flippase

ROS : ''Reactive Oxygen Specie''

Rpm : Rotations par minute

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

S. cervisiae : *Saccharomyces cervisiae*

SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium

Ser (S) : Sérine

SG1 : Sérine Galactosyltransférase

Sia : Acide Sialique

SOC : "Super Optimal broth with Catabolite"

SPE : ''Solid Phase Extraction''

SPN : Surnageant

SPS : *N*-acétylneuraminate-9-Phosphate Synthase

ST : Sialyltransférase

SUP : Phase Supérieure

TAE : Tris Acétate EDTA

TAP : Tris Acétate Phosphate

TALEN : "Transcription Activator-Like Effector Nuclease"

T. reesei : *Trychoderma reesei*

T. brucei : *Trypanosoma brucei*

TBS : "Tris Buffered Saline"

TBST : "Tris Buffered Saline" + Tween 0,1%

TEM/MET : ''Transmission Electron Microscopy''/ Microscopie Electronique à Transmission

TEMED : Tétra Méthyl Ethylène Diamine

TFA: Acide Trifluoro Acétique

***T. gondii* :** *Toxoplasma gondii*

Thr (T) : Thréonine

TNF: “Tumor Necrosis Factor”

TOF : “Time Of Flight”

TPT : Triose Phosphate Translacator

Trp (W) : Tryptophane

TTP : Thymine Triphosphate

Tyr (Y) : Tyrosine

UDP : Uridine Diphosphate

UGT/UGGT : UDP-glucose: Glycoproteine Glucosyltransférase

UMP : Uridine Monophosphate

Und-P : Undercaprénol Phosphate

UV : UltraViolet

Val (V) : Valine

Xyl : Xylose

XylT/XT : Xylosyltransférase

$ZnCl_2$: Chlorure de Zinc

$ZnSO_4$: Sulphate de Zinc

Liste des figures

Figure 1: Evolution du nombre de biomédicaments mis sur le marché au cours du temps (Walsh, 2018) 34

Figure 2 : Evolution de la production de protéines thérapeutiques dans des cellules de mammifères (Walsh, 2018). 39

Figure 3 : Biosynthèse du dolichol-phosphate dans le cytoplasme et dans le RE d'après (Cartagrel et al., 2010). 44

Figure 4 : Biosynthèse du précurseur oligosaccharidique $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol d'après (Aebi, 2013). 45

Figure 5 : Etapes du contrôle qualité des protéines *N*-glycosylées au sein du RE (Tannous et al., 2015). 50

Figure 6 : Schéma résumant les grandes étapes de synthèse des *N*-glycannes complexes dans l'appareil de Golgi humain d'après (Donadio-Andréi et al., 2012). 52

Figure 7 : La maturation des *N*-glycannes de levure dans l'appareil de Golgi d'après Pourcq et al., 2010. 55

Figure 8 : Maturation des *N*-glycannes de plantes au sein de l'appareil de Golgi d'après (Strasser, 2016). 57

Figure 9 : Biosynthèse du *N*-glycanne précurseur chez *T. gondii* d'après (Garénaux et al., 2008). 59

Figure 10 : Représentation des différents cores mucines fréquemment retrouvés chez les mammifères d'après (Gomord et al., 2010). 62

Figure 11 : Représentation des *O*-glycannes de type AGPs et EXTs présent chez les plantes d'après (Nguema-Ona et al., 2014). 64

Figure 12 : Résumé des étapes d'humanisation des voies de *N*-glycosylation chez la levure d'après (Pourcq et al., 2010). 71

Figure 13 : Humanisation de la voie de *N*-glycosylation chez les plantes, modifié d'après (Chen, 2016) 77

Figure 14 : Arbre phylogénétique des microalgues d'après (Keeling, 2013). 79

Figure 15 : Schéma détaillé de la structure cellulaire de *C. reinhardtii* d'après (Sasso et al., 2018) 80

Figure 16 : Maturation des *N*-glycannes chez la microalgue *C. reinhardtii* d'après Mathieu-Rivet et al., 2013 ; 2014. 87

Figure 17 : Hypothèse du processus de maturation des *N*-glycannes chez la microalgue *P. tricornutum* 88

***Figure 18 : O*-glycannes de type HRGPs retrouvés chez *C. reinhardtii* d'après (Bollig et al., 2007). 90**

Figure 19 : Schéma d'insertion de la cassette CIB1 sur le gène Cre09.g391282 du mutant IM_{XTA} (LMJ.RY0402.087519). 198

Figure 20 : Schéma d'insertion de la cassette CIB1 sur le gène Cre16.g678997 du mutant IM_{XTB} (LMJ.RY0402.118417). 198

Figure 21 : Illustration de la reproduction sexuée et asexuée chez la microalgue *C. reinhardtii*. 202

Figure 22 : Résumé des différentes étapes d'obtention des précurseurs oligosaccharidiques 206

Figure 23 : Taille en kilodalton (kDa) des bandes du marqueur de taille protéique Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder 210

Figure 24 : Schématisation de l'empilement effectué dans la cassette Pierce Power blot lors du transfert. . 210

Figure 25 : Mode d'action de la PNGase F sur les N-glycannes. (Maley et al., 1989). 213

Figure 26 : Illustration des profils glycanniques suite aux digestions enzymatiques α(1,2)-mannosidase et α-mannosidase extraite du haricot (Jack bean)....219
Figure 27 : Schématisation de la vérification de la mutation par PCR....228
Figure 28 : Schématisation de l'amplification des jonctions génome-cassette 228
Figure 29 : Plasmide RBCS2/HSP70A-cEPO 233
Figure 30 : Carte du vecteur plasmidique Pks APHVIII-lox....234
Figure 31 : Carte du vecteur plasmidique Pks APHVII-lox....235
Figure 32 : Schématisation de la recombinaison plasmidique Cre/Lox....236
Figure 33 : Plasmide de fusion Pks TbGT11-V5-RBCS2/HSP70A-APHVIII (A) et Pks TbGT15-HA-RBCS2/HSP70A-APHVIII (B)....237
Figure 34 : Plasmide de fusion Pks AsManHDEL-c-myc-RBCS2/HSP70A-APHVII (A) et Pks TrManHDEL-c-myc-RBCS2/HSP70A-APHVII (B) 238
Figure 35 : Schéma bilan des perspectives d'humanisation de la voie de *N*-glycosylation chez *C. reinhardtii.* 253

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différences entre les différents systèmes de production de biomédicaments d'après (Yao et al., 2015). 42
Tableau 2 : Exemples de protéines recombinantes produites dans des plantes et en phase d'essai clinique d'après (Yao et al., 2015).....42
Tableau 3 : Protéines recombinantes produites dans la microalgue *C. reinhardtii* 83
Tableau 4 : Protéines recombinantes produites dans la diatomée *P. tricornutum*.....84
Tableau 5 : Structures des *N*-glycannes complexes majoritairement retrouvées chez d'autres microalgues...89
Tableau 6 : Composition détaillée du milieu Tris Acétate Phosphate (TAP).....200
Tableau 7 : Composition détaillée du milieu eau de mer 100% 201
Tableau 8 : Formulation du Beijerink N10.....203
Tableau 9 : Préparation de gel d'acrylamide bis-tris (4-12%) 209
Tableau 10 : Récapitulatif des conditions de transfert par type et nombre de gel utilisé.....211
Tableau 11 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés et leurs dilutions.....211
Tableau 12 : Liste des amorces utilisées avec leurs séquences nucléotidiques, leurs gènes cibles, la taille attendue des fragments amplifiés et les températures d'hybridation (Tm) en PCR. 225
Tableau 13 : Mélange PCR effectué par échantillon.....226
Tableau 14 : Résumé d'un programme de PCR dans le thermocycleur. 226
Tableau 15 : Biais de codon du génome nucléaire chez *C. reinhardtii*.....230

Présentation du candidat

PRESENTATION DU CANDIDAT



PIERRE-LOUIS LUCAS

Date de naissance : 11/07/1992

Adresse : 17 rue du Bec, 76 000 Rouen, FRANCE

Portable : +33-642-879-889

E-mail : lucas.pierrelouis14@gmail.com

Parcours

2019 : Doctorat en Aspects moléculaires et Cellulaires de la Biologie, Etude et ingénierie de la voie de *N*-glycosylation des protéines chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Glyco-MEV EA4358, Université de Rouen Normandie, FRANCE)

2016 : Diplôme d'Ingénieur en Agriculture, Agronomie et Environnement (UniLasalle, Campus de Rouen, FRANCE)

2016 : Master Agrosciences, Sciences du Végétal, Ecoproduction et Biovalorisation (EcoBioValo**)** (Université de Rouen Normandie, FRANCE)

2015 : Semestre Erasmus, Université Norvégienne des Sciences de la Vie (NMBU, NORVEGE)

2011 : Classe préparatoire BCPST

2010 : Baccalauréat série S, Chartres, France

Expériences professionnelles

Octobre 2016-2019 : Doctorat, « Etude et ingénierie de la voie de *N*-glycosylation des protéines chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii »* (Glyco-MEV EA4358, Université de Rouen Normandie, FRANCE)

- **Production d'OGMs de microalgues et caractérisation de mutants de la *N*-glycosylation**
- **Analyses par spectrométrie de masse des *N*-glycannes de microalgues**
- **Participation à des congrès scientifiques**
- **Publications d'articles scientifiques**

Février-Aout 2016 : Stage ingénieur et recherche (M2R), « Caractérisation des précurseurs oligosaccharidiques chez *Chlamydomonas reinhardtii* » (Glyco-MEV EA4358, Université de Rouen Normandie, FRANCE)

- **Elaboration d'un protocole d'extraction des intermédiaires glycanniques liés aux lipides**
- **Analyses des oligosaccharides libérés par spectrométrie de masse**

Janvier-Juillet 2015 : Stage ingénieur, « Optimisation de culture de microalgues en photobioréacteur en mode turbidostat » (CEA Cadarache, FRANCE)

- **Culture de microalgues en bioréacteur**
- **Analyses quantitative et qualitative des lipides, protéines et glucides**

Février-Avril 2014 : Stage ingénieur, « Etude d'un élevage caprin » (Onzain, FRANCE)

- **Traite et fabrication de fromage**
- **Elaboration d'un rapport technico-économique de l'exploitation agricole.**

Juin-Aout 2013 : Stage, ranger volontaire dans une réserve naturelle (Durlston Country Park, ANGLETERRE)

Juillet-Aout 2012 : Stage, ouvrier agricole dans une exploitation laitière (Le Mesnil sur Blangy, FRANCE)

Production scientifique

Publications en premier auteur	Publications autre position	Communications orales	Posters
3	1	6	7

Publications

Gaëtan Vanier, **Pierre-Louis Lucas**, Corinne Loutelier-Bourhis, Jessica Vanier, Carole Plasson, Marie-Laure Walet-Balieu, Philippe Chan Tchi-Song, Isabelle Remy-Jouet, Vincent Richard, Sophie Bernard, Azeddine Driouich, Carlos Afonso, Patrice Lerouge, Elodie Mathieu-Rivet, Muriel Bardor. Heterologous expression of the *N*-acetylglucosaminyltransferase I dictates a reinvestigation of the *N*-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* Scientific Reports, Nature Publishing Group, 2017, 7 (1), pp.10156 - 10156. ⟨10.1038/s41598-017-10698-z⟩ (*IF* : 4.12)

Pierre-Louis Lucas, Rodolphe Dumontier, Corinne Loutelier-Bourhis, Alain Mareck, Carlos Afonso, Patrice Lerouge, Narimane Mati-Baouche, Muriel Bardor. User-friendly extraction and multistage tandem mass spectrometry based analysis of lipid-linked oligosaccharides in microalgae Plant Methods, BioMed Central, 2018, 14 (1), pp.e107. ⟨10.1186/s13007-018-0374-8⟩ (*IF*: 4.5)

Pierre-Louis Lucas, Elodie Mathieu-Rivet, Philippe Chan, Anne Oltmanns, Corinne Loutelier-Bourhis, Carole Plasson, Carlos Afonso, Michael Hippler, Patrice Lerouge, Narimane Mati-Baouche, Muriel Bardor. Xylosylation of protein *N*-linked glycans in *Chlamydomonas reinhardtii* is heterogeneous and mediated by a multigene xylosyltransferase family. *Soumis à* Plant journal, 2019. (*IF* : 5.7)

Yngvar Gauslaa, Md**.** Azharul Alam, **Pierre-Louis Lucas**, Dipa Paul Chowdhury, Knut Asbjørn Solhaug. Fungal tissue *per se* is stronger as a UV-B screen than secondary fungal extrolites in *Lobaria pulmonaria.* Fungal Ecology. 2017, 26(1), (10.1016/j.funeco.2017.01.005) (IF : 3.73)

Communications Orales

Pierre-Louis Lucas, Gaëtan Vanier, Clément Ovide, Marie-Christine Kiefer-Meyer, Carole Plasson, Carole Burel, Alain Mareck, Bruno Gügi, Elodie Rivet, Patrice Lerouge, Muriel Bardor. Understanding the *N*-glycosylation of microalgae: a critical prerequisite towards optimizing the production of biopharmaceuticals, 6th Congress of the international society for Applied phycology, June 2017, Nantes, France

Pierre-Louis Lucas, Corinne Loutelier-Bourhis, Philippe Chan, Patrice Lerouge, Elodie Mathieu-Rivet, Narimane Mati-Baouche, Muriel Bardor. *N*-glycosylation in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, 21èmes journées de l'Ecole Doctorale NBise, March 2018, Mont-Saint-Aignan, France

Pierre-Louis Lucas, Corinne Loutelier-Bourhis, Philippe Chan, Patrice Lerouge, Elodie Mathieu-Rivet, Narimane Mati-Baouche, Muriel Bardor. *N*-glycosylation in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, 27èmes Journées du Groupe Francais des Glycosciences, May 2018, Nouan le Fuzelier, France

Narimane Mati-Baouche, Baptiste Lebreton, Paul Ferrand, **Pierre-Louis Lucas**, Patrice Lerouge, Muriel Bardor. Characterization of the glucosidases I and II in the green microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, 27èmes Journées du Groupe Français des Glycosciences, May 2018, Nouan le Fuzelier, France

Pierre-Louis Lucas, Rodolphe Dumontier, Corinne Loutelier-Bourhis, Carole Plasson, Carole Burel, Alain Mareck, Carlos Afonso, Patrice Lerouge, Marie-Christine Kiefer-Meyer, Narimane Mati-Baouche, Muriel Bardor. Understanding the regulation of the *N*-glycosylation pathway is a prerequisite to optimize microalgae as a cell factory for the production of biopharmaceuticals, 3rd Conference of the International Society for Plant Molecular Farming, June 2018, Helsinki, Finland

Muriel Bardor, **Pierre-Louis Lucas**, Corinne Loutelier-Bourhis, Philippe Chan, Carole Plasson, Carlos Afonso, Narimane Mati-Baouche, Patrice Lerouge. *Chlamydomonas reinhardtii* as a green microalga to understand evolution of the *N*-glycosylation pathways in microalgae, 29th International Carbohydrate Symposium (ICS), July 2018, Lisbonne, Portugal

Posters

Pierre-Louis Lucas, Corinne Loutelier-Bourhis, Gaëtan Vanier, Jessica Vanier, Philippe Chan Tchi-Song, Elodie Rivet, Patrice Lerouge, Muriel Bardor. Structural characterization of the dolichol linked precursor in the green microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, 19th European Carbohydrate Symposium Eurocarb, June 2017, Barcelona, Spain

Pierre-Louis Lucas, Corinne Loutelier-Bourhis, Gaëtan Vanier, Jessica Vanier, Philippe Chan Tchi-Song, Elodie Rivet, Patrice Lerouge, Muriel Bardor, Structural characterization of the dolichol linked precursor in the green microalgae*, Chlamydomonas reinhardtii*, 1ères journées SFR Normandie Végétale, July 2017, Rouen, France

Gaëtan Vanier, **Pierre-Louis Lucas**, Corinne Loutelier-Bourhis, Jessica Vanier, Carole Plasson, Marie-Laure Walet-Balieu, Philippe Chan Tchi-Song, Isabelle Remy-Jouet, Vincent Richard, Sophie Bernard, Azeddine Driouich, Carlos Afonso, Patrice Lerouge, Elodie Mathieu-Rivet, Muriel Bardor. Heterologous expression of the *N*-acetylglucosaminyltransferase I dictates a reinvestigation of the *N*-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*, 1ère journée de la SFR Normandie Végétal, Rouen, July 2017, Rouen, France

Narimane Mati-Baouche, Baptiste Lebreton, Paul Ferrand, **Pierre-Louis Lucas**, Patrice Lerouge, Muriel Bardor. Characterization of the glucosidases I and II in the green microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, 27èmes Journées du Groupe Français des Glycosciences, May 2018, Nouan le Fuzelier, France

Rodolphe Dumontier**, Pierre-Louis Lucas**, Corinne Loutelier-Bourhis, Alain Mareck, Carlos Afonso, Patrice Lerouge, Narimane Mati-Baouche, Muriel Bardor. A simple and non-radioactive method to characterize lipid-linked oligosaccharides in microalgae, 2èmes journées de la SFR Normandie Végétale, May 2018, Deauville, France

Narimane Mati-Baouche, Baptiste Lebreton, Paul Ferrand, **Pierre-Louis Lucas**, Patrice Lerouge, Muriel Bardor. Toward characterizing the glucosidases in the green microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, 29th International Carbohydrate Symposium, July 2018, Lisbonne, Portugal

Pierre-Louis Lucas, Narimane Mati-Baouche, Philippe Chan Tchi-Song, Corinne Loutelier-Bourhis, Carlos Afonso, Elodie Mathieu-Rivet, Patrice Lerouge, Muriel Bardor. Characterisation of *N*-glycan structures in *Chlamydomonas reinhardtii* xylosyltransferase mutants, 22èmes journées de l'Ecole Doctorale NBise, March 2019, Caen, France

Mobilité durant la thèse

Mobilité de 2 mois au sein de l'institut de Biologie et Biotechnologies végétales de l'Université de Münster (Allemagne), sous l'encadrement du Pr Michael Hippler. Formation au croissement sexué de la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* en vue d'obtenir des doubles mutants de glycosylation. Analyse des *N*-glycannes par une approche de glycoprotéomique.

Formations

Formation sécurité intelligence économique

Initiation à la lecture rapide

Comprendre le monde de l'entreprise

Connaitre le marché de l'emploi

Entretien de recrutement

Place du e-recrutement

Spectrométrie de masse

Responsabilités collectives

Représentant élu des doctorants du laboratoire Glyco-MEV EA4358 au conseil de laboratoire de 2016 à 2019

Membre du comité d'organisation des 21èmes journées de l'école doctorale NBise (21èmes JED Rouen)

Membre de la société savante « Groupe Français des Glycosciences » depuis 2018

Animateur d'un atelier pédagogique « Le Végétal de précision » lors des 26, 27 et 28 èmes journées de la Fête de la Science (Madrillet, France) de 2017 à 2019

Représentant doctorant de plusieurs comités de suivi de thèse de 2018 à 2019

Aptitudes

Windows, Mac Os, Word, Excel, Powerpoint, Matlab, Gimp

Français : Langue maternelle **; Anglais** : niveau B2 (TOEIC 820) ; **Espagnol** : niveau B2

Permis de conduire : catégorie B

Introduction

I) Production de protéines recombinantes

Au travers de cette première partie, la définition du terme « biomédicaments », dont font parties les protéines recombinantes, sera abordée ainsi qu'une description des différentes sous-classes de molécules actuellement sur le marché. Cette partie traitera également des différentes modifications post-traductionnelles présentes sur ces protéines recombinantes et leurs importances pour l'activité de la molécule.

A) Généralités sur les biomédicaments

Les biomédicaments, également appelés médicaments biologiques, sont des molécules dont la substance active est produite ou extraite à partir d'une source biologique (Article L5121-1 du Code de la santé publique). Ces molécules complexes se distinguent également des autres médicaments par leur taille pouvant être jusqu'à 1000 fois supérieure (Parkins and Lashmar, 2000). Bien que le terme « biomédicament » soit accepté par la médecine moderne, il rencontre de nombreuses confusions sur sa définition. Afin d'éviter ces confusions, le terme « biomédicaments » concernera, dans ce manuscript, tous les produits thérapeutiques obtenus par des moyens biotechnologiques modernes comme les produits basés sur de l'ADN recombinant ou sur des hybridômes (Walsh, 2002).

B) Notion de protéines recombinantes

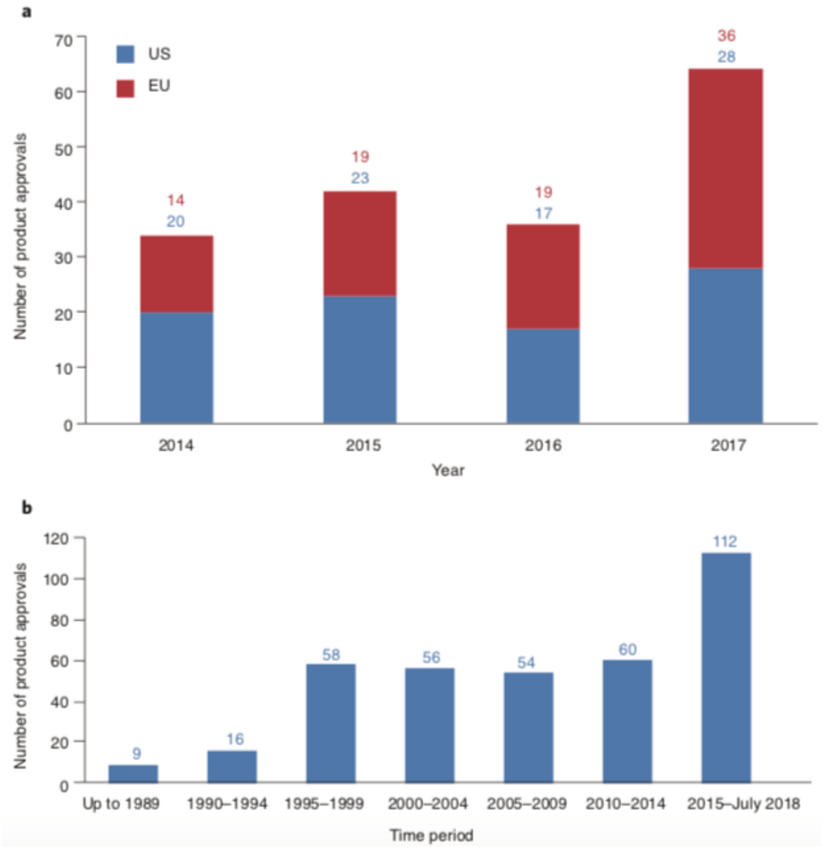
Parmi les biomédicaments, les protéines recombinantes thérapeutiques produites par technologie d'ADN recombinant dans différents systèmes d'expression ont été les molécules les plus produites et celles qui ont connu la plus grande hausse sur le marché des produits pharmaceutiques (Walsh, 2014).

Le développement de la technologie d'ADN recombinant au milieu des années 70 a marqué le commencement de la production des protéines recombinantes par des processus de biotechnologie. Depuis la commercialisation en 1982 de l'insuline, produite de manière recombinante dans la bactérie *Escherichia coli* (Johnson, 1983; Williams et al., 1982), des centaines de protéines recombinantes incluant les anticorps monoclonaux (mAbs), ont été fabriquées par génie génétique et approuvées par les autorités pour une utilisation en thérapie humaine avec notamment 112 autorisations de mise sur le marché sur la période 2015-2018, dont 36 aux États-Unis et 28 en Europe sur la seule année 2017 **(*Figure 1.a*)**

(Walsh, 2018). Depuis 5 ans, le nombre de biomédicaments autorisés sur le marché est en forte hausse avec 112 autorisations entre 2015 et 2018 contre 60 seulement entre 2010 et 2014 ***(Figure 1.b)***.

Aujourd'hui, les protéines recombinantes représentent un marché dépassant les 180 milliards de Dollars américains, soit 20% du marché total des produits pharmaceutiques (Walsh, 2018). Les mAbs représentent à eux seuls environ 50% du chiffre d'affaire de tous les biomédicaments.

Les protéines recombinantes peuvent être divisées en cinq groupes distincts : les cytokines, les hormones, les enzymes, les anticorps et les vaccins.



<u>Figure 1 : Evolution du nombre de biomédicaments mis sur le marché au cours du temps (Walsh, 2018)</u>

*Le diagramme **a** présente l'évolution comparative du nombre d'autorisations de mise sur le marché entre 2014 et 2017 des biomédicaments en Europe et aux USA. Le diagramme **b** présente le nombre d'autorisations de mise sur le marché des protéines thérapeutiques dans le monde sur une période allant de 1989 à 2018.*

1) Hormones

Les hormones sont des substances chimiques produites et secrétées par des cellules glandulaires. Elles jouent un rôle de messager entre les divers organes. Une fois dans la circulation sanguine, elles vont pouvoir se déplacer jusqu'aux récepteurs d'une cellule cible et transférer un message sous forme chimique. Les hormones sont réparties en quatre classes, les hormones peptidiques comme l'insuline, les hormones stéroïdiennes comme le cholestérol, les hormones lipidiques et les hormones dérivées d'acides aminés (Raven et al., 2010). Grace aux avancées dans la technologie de l'ADN recombinant, les hormones, initialement extraites et purifiées à partir d'organes humains ou animales, ont été les premières protéines thérapeutiques produites comme l'insuline dans la bactérie *E. coli* en 1982 (Ho and Gibaldi, 2013). Ainsi, l'insuline recombinante a été la protéine recombinante la plus vendue en 2013 avec une recette de 21,5 milliards de Dollars, ce qui correspond à 60% du marché des médicaments ciblés contre le diabète (Walsh, 2014).

2) Cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines pouvant être membranaires ou sécrétées suite à une stimulation. Ayant un rôle dans la communication intercellulaire, les cytokines se différencient, cependant, des hormones sur plusieurs points. Tout d'abord, à l'inverse des hormones secrétées par un type de cellule précis et localisé, les cytokines peuvent être secrétées par plusieurs types cellulaires. De même, les cibles visées et les activités des cytokines sont multiples, alors que les hormones sont plus spécifiques de leurs cibles et ont une activité unique ou restreinte. Le mode d'action de ces deux molécules diffère également. En effet, dans le cas des hormones, leur action se réalise uniquement sur des cellules cibles distantes, alors que pour les cytokines peuvent agir sur des cellules proches, des cellules distantes, des cellules en contact ainsi que sur les cellules productrices elles-mêmes. Il existe quatre classes de cytokines nommées interleukines, facteurs de nécroses tumorales (TNF), chimiokines et interférons (Henderson, 1995; Ellerin et al., 2003).

3) Enzymes

Les enzymes sont des protéines ayant la capacité de catalyser des réactions chimiques qui prendraient plus de temps en leur absence, sans pour autant être modifiées au cours de la réaction catalytique. Elles peuvent ainsi être réutilisées plusieurs fois (Berg et al., 2002). Les enzymes diffèrent de la plupart des autres types de catalyseurs par leur grande spécificité vis-

à-vis de leurs substrats, spécificité essentiellement due à la structure tridimensionnelle de l'enzyme. De plus, l'activité d'une enzyme est modulée par diverses autres molécules, par exemple, un inhibiteur sera une molécule qui aura la capacité de ralentir l'activité d'une enzyme, tandis qu'un activateur accélèrera l'activité de cette même enzyme. L'utilisation d'enzyme comme biomédicament a permis de soigner de nombreuses pathologies. A titre d'exemple, la glucocérébrosidase a été produite de manière recombinante dans des cellules de mammifères pour soigner les patients atteint de la maladie de Gaucher (Pastores, 2010). La maladie de Gaucher est une maladie héréditaire ayant pour cause une anomalie de dégradation d'un lipide appelé glucocérébroside provocant l'accumulation de ce dernier dans différents tissus. La glucocérébrosidase est ainsi utilisée dans le traitement de la maladie de Gaucher pour empêcher l'accumulation des glucocérébrosides dans le lysosome (Grabowski, 1995).

4) Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (mAbs) sont des glycoprotéines complexes de la famille des immunoglobulines, utilisés dans le traitement de maladies auto-immunes ou de cancers (Elvin et al., 2013). A la différence des anticorps polyclonaux, les anticorps monoclonaux sont spécifiques et ne reconnaissent qu'un seul épitope antigénique. Comme tous les anticorps, les mAbs sont constitués de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, reliées entre elles par des ponts disulfures. La structure protéique est divisée en une partie semblable pour la plupart des immunoglobulines appelée région constante (Fc), et une partie variable possédant le site de reconnaissance pour l'antigène (Fab). La totalité des anticorps monoclonaux actuellement disponibles sur le marché des biomédicaments appartiennent à la classe des immunoglobulines G (IgG) reparties en quatre sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4), dont 79% actuellement sur le marché sont des IgG1 (Grilo and Mantalaris, 2019).

5) Vaccins

Les vaccins sont utilisés pour stimuler le système immunitaire à produire des anticorps ciblés contre un antigène cible. L'antigène présent dans les vaccins peut être de quatre natures différentes : agents infectieux inactivés, agents vivants atténués, sous-unités d'agents infectieux et toxines ayant perdu leurs propriétés toxiques. La technologie de l'ADN recombinant a permis d'élargir la voie de production des vaccins. A titre d'exemple, 10% de la

production des vaccins, en 2014, ont été produits par biotechnologie (Walsh, 2014). Cette technique nécessite d'isoler les gènes codants pour les antigènes du virus, d'exprimer dans des systèmes d'expression ces antigènes qui, une fois purifiés, fournissent les principes actifs des vaccins sous-unitaires.

C) Importance des modifications post-traductionnelles

Bien que les protéines thérapeutiques aient révolutionné le traitement de nombreuses maladies, l'activité et l'immunogénicité de ces molécules demeurent de réels challenges lors de la production de ces biomédicaments (Li and d'Anjou, 2009). En effet, les protéines recombinantes sont, le plus souvent, des molécules de grandes tailles (supérieure à 100 kDa), complexes et qui requièrent du fait de leur nature, des modes de production différents, des temps de production plus long ainsi que des modifications post-traductionnelles (*Post-Translational Modifications* : PTMs). La majorité des protéines présentent une ou plusieurs PTMs qui ont une influence sur leurs propriétés biologiques et thérapeutiques. Parmi les PTMs existants sur les protéines, nous pouvons citer la γ-carboxylation, l'oxydation, la déamidation, la β-hydroxylation, la sulfation, l'amidation et la glycosylation (Krishna and Wold, 1993).

La glycosylation est un processus enzymatique intervenant dans le réticulum endoplasmique (RE) ainsi que dans l'appareil de Golgi consistant à lier de façon covalente un motif oligosaccharidique appelé glycanne sur une séquence peptidique bien précise (Dingermann, 2008). Cette PTM est la plus complexe et la plus répandue, notamment, chez l'Homme, organisme pour lequel 50% des protéines sont glycosylées (Wong, 2005), mais également sur le marché des biomédicaments puisqu'environ 70% de toutes les protéines thérapeutiques mises sur le marché sont des glycoprotéines (Sethuraman and Stadheim, 2006). Les machineries de glycosylation sont présentes, mais différentes chez la quasi-totalité des organismes eucaryotes comme les mammifères, les levures et les plantes. Il existe plusieurs formes de glycosylation des protéines dont les processus de *N*- et *O*-glycosylation sont les principales.

La présence des glycannes est très importante pour la production de protéines thérapeutiques. Nombreuses sont les tentatives de productions qui ont échoué en absence de glycosylation, comme cela fût le cas pour l'Erythropoïétine (EPO), qui initialement produite dans *E. coli* n'était pas pleinement active *in vivo* (Sasaki et al., 1987). Cependant, pour

certaines protéines recombinantes, la présence de glycanne n'est pas impérative. Il a, en effet, été montré dans le cas de l'interleukine-2, facteur glycosylé de nécrose tumoral (TFN), que la protéine avait une activité thérapeutique bien qu'elle soit dépourvue de glycosylation car produite chez *E. coli* (Dingermann, 2008) .

La *O*- et *N*-glycosylation étant les formes les plus fréquentes et importantes pour les protéines recombinantes, seules ces deux modifications seront détaillées dans les paragraphes III et IV de cette synthèse bibliographique.

II) Différents systèmes de production

L'utilisation de l'ADN recombinant dans diffèrents systèmes d'expression a permis d'augmenter, considérablement, la disponibilité des protéines recombinantes. Cependant, les systèmes de production ont montré leurs limites en termes de rendement, de coût ou de capacité à fournir une molécule entièrement fonctionnelle, poussant les chercheurs à développer des systèmes alternatifs de production.

Le paragraphe suivant présente les différents systèmes d'expression utilisés, à l'heure actuelle, pour la production de protéines recombinantes ainsi que les autres alternatives actuellement étudiées en vue de répondre à la hausse croissante de l'utilisation de ces biomédicaments et de proposer des procédés de production moins onéreux.

A) Cellules de mammifères

Les cellules de mammifères sont actuellement les systèmes d'expression les plus utilisés pour la production de protéines nécessitant des modifications post-traductionnelles ***(Figure 2)***. En effet, les cellules de mammifères ont été choisies pour la production de protéines recombinantes thérapeutiques en raison de la similarité des profils glycanniques de leurs glycoprotéines comparées aux glycoprotéines humaines, ainsi que pour leur capacité à secréter les protéines d'intérêt dans le milieu de culture (Hossler et al., 2009). Parmi les cellules de mammifères disponibles, les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) sont devenues les lignées cellulaires les plus utilisées pour la production commerciale de protéines recombinantes. A titre d'exemple, sur la période allant de 2014 à 2018, plus de 80% des protéines recombinantes thérapeutiques acceptées sur le marché ont été produites au sein du système CHO (Walsh, 2018). Plusieurs facteurs expliquent ce succès : les cellules CHO ont

été les premières cellules hôtes utilisées pour la production d'activateur de tissus plasminogène (t-PA) qui a été, en 1989, le premier biomédicament recombinant produit par ce système à obtenir une autorisation de mise sur le marché (Parekh et al., 1989). De plus, ces cellules sont également capables de croitre en suspension et dans un bioréacteur (Heath and Kiss, 2007; Xing et al., 2009) où elles peuvent être adaptées à un milieu de culture défini. Toutefois, il existe d'autres lignées cellulaires disponibles pour la production de protéines recombinantes et dont le profil glycosylation des protéines est proche de celui de l'Homme. Parmi ces lignées, nous pouvons citer les cellules rénales de bébé hamster (BHK21), les cellules de myélome de souris (NS0), les cellules rénales d'embryon humain (HEK-293) et les cellules dérivées de la rétine humaine (PER-C6) (Butler, 2005).

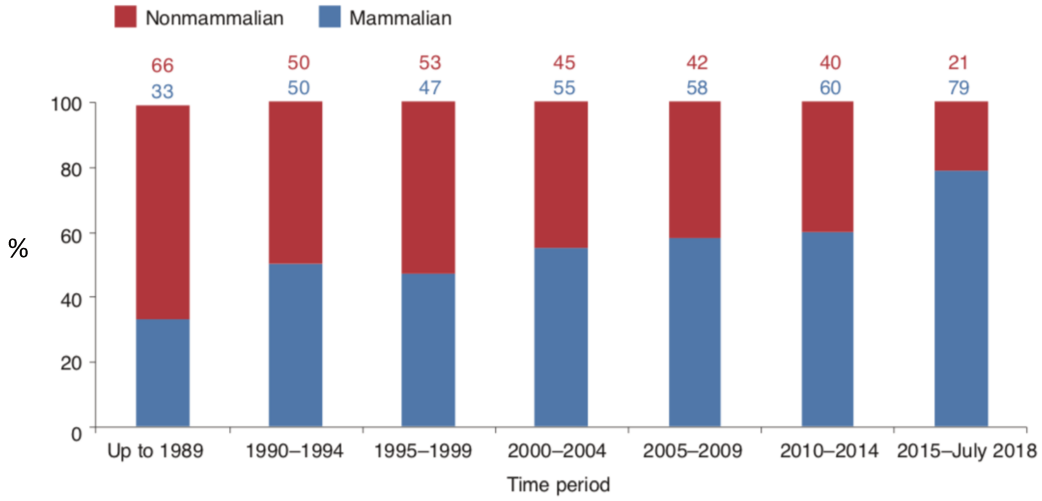


Figure 2 : Evolution de la production de protéines thérapeutiques dans des cellules de mammifères (Walsh, 2018). *Diagramme représentant le pourcentage de protéines thérapeutiques mises sur le marché entre 1989 et 2018 selon le type cellulaire dans lequel elles ont été produites, mammifère en bleu ou non-mammifère en rouge.*

La quantité de protéines recombinantes produites dans les systèmes à base de cellules de mammifères a augmenté d'au moins 20 fois sur 20 ans (De Jesus and Wurm, 2011). Ceci est lié au fait que ces cellules peuvent produire des quantités toujours plus importantes de protéines recombinantes. Pour cela, il faut être capable de garder les cellules viables par ajout contrôlé de nutriments azotés et carbonés lors de leurs cultures en bioréacteur pour qu'elles puissent continuer à produire des protéines recombinantes (Wurm, 2004). Ce contrôle de nutriment a permis d'augmenter la productivité tout en minimisant la production de co-produits comme le lactate et a permis de garder un haut pourcentage de viabilité cellulaire sur une plus longue durée. Cette augmentation de la viabilité a conduit à des cultures produisant initialement 1 million de cellules par mL sur 7 jours à des cultures pouvant

atteindre 21 jours avec une concentration cellulaire proche de 10 millions de cellules par mL. Ces avancées dans l'amélioration cellulaire et l'apport de nutriment ont permis *in fine* d'augmenter la production de protéines recombinantes de 100 $mg.L^{-1}$ à 5 $g.L^{-1}$ aujourd'hui (De Jesus and Wurm, 2011).

Cependant, certains problèmes demeurent et méritent un intérêt particulier pour améliorer la production de protéines recombinantes produites dans les cellules de mammifères. En effet, les glycoprotéines peuvent porter plusieurs glycoformes différentes, ce qui peut limiter l'efficacité de la molécule et freiner son autorisation de mise sur le marché (Butler, 2005). Actuellement, il est possible dans certains cas, comme pour la glucocérébrosidase, de palier à cette hétérogénéité en effectuant des étapes de purification successives pouvant être suivis par des traitements enzymatiques permettant de générer une structure glycannique unique et adéquate (Lingg et al., 2012). De plus, il est à noter que les cellules humaines contrairement aux autres mammifères ne sont pas capables de synthétiser certains épitopes glycanniques comme l'épitope α(1,3)-galactose, ou encore l'acide sialique *N*-glycolyneuraminique (Neu5Gc) (Bardor et al., 2005; van Beers and Bardor, 2012; Wang et al., 2015) qui sont capables, lorsqu'ils sont présents sur un biomédicament, d'induire une réponse immunitaire voire allergique lors d'une injection chez l'Homme (Ghaderi et al., 2010).

Comme certaines cellules de mammifères utilisées pour produire des protéines recombinantes sont susceptibles de synthétiser ces épitopes immunogènes, l'efficacité de ces protéines recombinantes en est diminuée voire risquée. Toutes ces contraintes participent aux coûts de production élevés de ces biomolécules ainsi qu'à la recherche d'organismes alternatifs comme les levures ou les plantes.

B) Levures

Les levures ont été proposées comme plateforme alternative aux cellules de mammifères pour la production de protéines recombinantes. Plusieurs raisons ont orienté ce choix, tout d'abord, les levures sont des organismes eucaryotes unicellulaires (Bill, 2001). De plus, les levures sont également capables de secréter des protéines dans le milieu extracellulaire, ce qui facilite la purification des protéines recombinantes. Les levures sont aussi très intéressantes du fait qu'elles possèdent des processus de modifications post-traductionnelles des protéines incluant entre autre l'élimination de peptides signaux,

l'assemblage de sous-unités protéiques et enfin la glycosylation des protéines (Demain and Vaishnav, 2009; Hou et al., 2012).

Actuellement, 20% des protéines recombinantes sont produites dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure a été reconnue comme un organisme GRAS (*Generally Recognized As Safe*) ce qui est bénéfique d'un point de vue réglementaire. *S. cerevisiae* est également une espèce dont les propriétés moléculaires, biochimiques ainsi que les techniques de manipulation sont bien maîtrisées (Berlec and Štrukelj, 2013). Cette espèce a également son génome entièrement séquencé ce qui facilite son utilisation en biotechnologie. L'insuline a été la première protéine recombinante à avoir été produite dans une levure et commercialisée, en 1987, sous l'appellation de Novolin (Kjeldsen et al., 2002; Meehl and Stadheim, 2014).

Cependant, bien que les levures soient capables de glycosyler les protéines, les glycannes synthétisés par les levures diffèrent très fortement des glycannes présents sur les glycoprotéines des mammifère (Pourcq et al., 2010). Ces structures seront détaillées ultérieurement (paragraphe III. B. 2).

C) Plantes

Plus récemment, les plantes ont émergé comme plateformes alternatives de production de protéines recombinantes. Ce choix a notamment été effectué pour la raison simple que les plantes ne peuvent pas être infectées par des pathogènes transmissibles à l'Homme. De plus, la capacité d'accumuler des protéines dans les graines ou dans d'autre organes avec un fort rendement, ainsi que l'utilisation d'infrastructures déjà existantes pour la production de ces cultures font des plantes un système de production ayant de nombreux intérêts économiques **(Tableau 1)**. Il a été estimé que les coûts de production de protéines recombinantes chez les plantes seraient 10 fois moindres que la même production de protéines chez *E. coli,* et jusqu'à 100 fois moins chers qu'une production en cellules de mammifères (Twyman et al., 2005). L'exemple de la glucocérébrosidase, produite dans des cellules de carotte sous la dénomination « Taliglucérase alfa », représente la première protéine recombinante ayant obtenue son autorisation de mise sur le marché en 2012 (Shaaltiel et al., 2007; Zimran et al., 2011). D'autres protéines recombinantes produites dans des plantes sont actuellement étudiées et en cours d'autorisation de mise sur le marché

(Tableau 2) (Yao et al., 2015). Cependant, il a été montré que les *N*-glycannes des protéines recombinantes produites par les plantes peuvent provoquer des réactions immunitaires chez l'Homme (Bardor et al., 2003).

Tableau 1 : Différences entre les différents systèmes de production de biomédicaments d'après (Yao et al., 2015).

Comparisons	Transgenic Plant	Plant Cell Culture	Bacteria	Yeast	Mammalian Cell Culture	Transgenic Animals
Overall cost	Very low	Medium	Low	Medium	High	High
Scale-up capacity	Very high	Medium	High	High	Very low	Low
Production scale	Worldwide	Limited	Limited	Limited	Limited	Limited
Protein yield	High	High	Medium	High	Medium-High	High
Protein folding accuracy	High	High	Low	Medium	High	High
Glycosylation	Minor differences	Minor differences	None	Incorrect	Correct	Correct
Product quality	High	High	Low	Medium	High	High
Contamination risks	Low	Low	Endotoxins	Low	Virus, Prions, oncogenic DNA	Virus, Prions, oncogenic DNA
Safety	High	Non-specific	Low	Unknown	Medium	High
Storage cost	Inexpensive	Moderate	Moderate	Moderate	Expensive	Expensive

Tableau 2 : Exemples de protéines recombinantes produites dans des plantes et en phase d'essai clinique d'après (Yao et al., 2015).

Product	Host	Application	Clinical Trial	Status	Sponsor
Taliglucerase alfa; Recombinant glucocerebrosidase (prGCD)	Carrot cell culture	Gaucher disease	NCT00376168	Phase 3 completed (2012); FDA approved (2012)	Protalix, Karmiel, Israel
ZMApp	Tobacco	Ebola Virus	NCT02363322	Phase 1 and 2 (2015)	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Bethesda, MD, USA
PRX-102	Tobacco cell culture	Fabry Disease	NCT01769001	Phase 1 and 2 (2014)	Protalix, Karmiel, Israel
VaccinePfs25 VLP	Tobacco	Malaria	NCT02013687	Phase 1 (2015)	Center for Molecular Biotechnology, Plymouth, MI, USA
Vaccine Recombinant protective antigen	Tobacco	Anthrax	NCT02239172	Phase 1 (2014)	Center for Molecular Biotechnology, Plymouth, MI, USA
HAI-05	Tobacco	H5N1 Vaccine	NCT01250795	Phase 1 (2011)	Center for Molecular Biotechnology, Plymouth, MI, USA
Recombinant human intrinsic factor	*Arabidopsis thaliana*	Vitamin B12 deficiency	NCT00279552	Phase 2 Completed (2006)	University in Aarhus, Aarhus, Denmark
H5-VLP + GLA-AF Vaccine	Tobacco	Influenza A Subtype H5N1 Infection	NCT01657929	Phase 1 Completed (2014)	Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA, USA
P2G12 Antibody	Tobacco	HIV	NCT01403792	Phase 1 Completed (2011)	University of Surrey, Guildford, UK

III) Les voies de la *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation des protéines et une étape cruciale pour le bon fonctionnement des glycoprotéines. L'ajout de *N*-glycannes sur les protéines nouvellement synthétisées va avoir d'importantes répercussions dans la durée de demi-vie de la glycoprotéine, ainsi que dans sa stabilité et son immunogénicité. La *N*-glycosylation a été jugée longtemps comme une modification post-traductionnelle des protéines n'étant présente uniquement que chez les organismes eucaryotes (Burda and Aebi, 1999). Or, certains organismes procaryotes sont

capables de synthétiser des structures glycanniques très différentes de celles présentes chez les eucaryotes (Kowarik et al., 2006).

Chez les organismes eucaryotes, les voies de la *N*-glycosylation sont divisées en deux grandes étapes. La première consiste à synthétiser un motif précurseur au sein du RE et à le transférer sur une protéine nouvellement produite. La deuxième étape consiste à envoyer la glycoprotéine vers l'appareil de Golgi et modifier le *N*-glycanne par l'action de glycosidases et de glycosyltransférases.

Le sous-chapitre suivant détaillera la synthèse du précurseur commun à tous les eucaryotes dans un premier temps, puis, présentera les différentes modifications opérées sur le *N*-glycanne dans l'appareil de Golgi des différents systèmes d'expression utilisés pour la production de protéines recombinantes. Enfin, dans un troisième temps, des cas particuliers de synthèse glycannique seront présentés.

A) Synthèse du précurseur oligosaccharidique

1) Synthèse cytosolique

Les premières étapes de la formation du précurseur oligosaccharidique consistent à ajouter sur la phase cytosolique du RE un motif composé de deux résidus *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et cinq résidus mannose (Man) sur une ancre lipidique particulière appelée dolichol (Dol)(Aebi, 2013).

Le dolichol est le point d'ancrage de l'oligosaccharide dans la membrane. Il consiste en un polyisoprène variant selon les espèces. A titre d'exemple, chez les mammifères, 18 à 21 résidus isoprènes sont généralement présents. Sa synthèse découle du farnésylpyrophosphate (FPP) transformé en polyprénylpyrophosphate (Poly-PP) par l'action d'une cis-prényl transférase appelée deshydrodolichyl-diphosphate synthase (DHDDS), en ajoutant des isopentenylpyrophosphates (IPP), qui représente la forme active de l'isoprène (Burda and Aebi, 1999; Cantagrel et al., 2010). Le polyprénylpyrophoshate est, par la suite, dépourvu de son groupement pyrophosphate et de son groupement phosphate par des enzymes, encore inconnues à ce jour, est devient un polyprénol. L'α-isoprène du polyprénol obtenu et, par la suite, réduit par une réductase NADPH-dépendante donnant ainsi naissance au dolichol. Ce dernier est, alors, converti en dolichol-phosphate (Dol-P) par une dolichol kinase (DK) qui effectue le transfert d'un phosphate d'une cytidine triphosphate (CTP) sur le

dolichol (Kranz et al., 2007). La **Figure 3** résume les étapes aboutissant à la formation du dolichol-phosphate dans le cytoplasme et dans le RE.

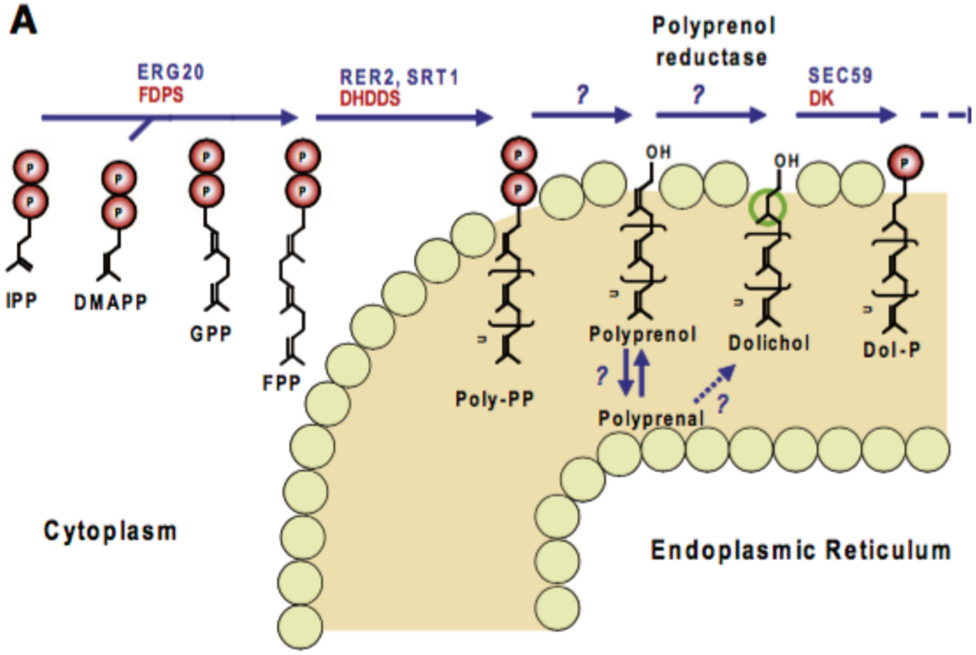


Figure 3 : Biosynthèse du dolichol-phosphate dans le cytoplasme et dans le RE d'après (Cartagrel et al., 2010).

La synthèse du Dolichol débute au niveau de la face cytosolique du RE où le farnésylpyrophosphate (FPP) est transformé par la deshydrodolichyl-diphosphate synthase (DHDDS) en polyprénylpyrophosphate (Poly-PP) lui-même converti en polyprénol, puis, en dolichol. Ce dernier est, finalement, converti en dolichol-phosphate (Dol-P) par action de la dolichol kinase (DK).

La formation du précurseur oligosaccharidique nécessite également la présence de trois nucléotides sucres : l'uridine diphosphate (UDP)-glucose, l'UDP-GlcNAc et la guanosine diphosphate (GDP)-mannose dérivant tous du glucose-1-phosphate et dont les synthèses effectuées dans le cytosol sont jugées conservées chez la plupart des eucaryotes. Ainsi, la synthèse du précurseur glycannique est initiée dans le cytosol par l'ajout d'un GlcNAc en β(1,4) sur un Dol-P formant ainsi un dolichol-pyrophosphate-GlcNAc (GlcNAc-PP-Dol). Cette réaction est catalysée par l'ajout d'un UDP-GlcNAc *via* une enzyme appelée ALG7 (ALG : Asparagine linked glycosylation) (Pretel et al., 1995).

Le GlcNAc-PP-Dol est ensuite pris en charge par un complexe formé de deux protéines ALG13 et ALG14 qui catalysent le transfert d'un deuxième GlcNAc sur le précédent avec une liaison en β(1,4). Bien que les deux enzymes soient nécessaires pour l'ajout du deuxième GlcNAc, il semblerait que l'activité catalytique soit uniquement présente sur ALG13 et que ALG14, possédant des domaines transmembranaires, permettrait de localiser la réaction sur

la membrane et participerait, également, à la reconnaissance du GlcNAc-PP-Dol (Bickel et al., 2005; Gao et al., 2005).

Une fois le $GlcNAc_2$-PP-Dol, également appelé motif chitobiose, formé, cinq mannoses vont successivement être ajoutés. Le premier mannose est ajouté sur le dernier GlcNAc du motif chitobiose avec une liaison en β(1,4) sous l'action de l'ALG1 (Couto et al., 1984). Deux mannoses sont, ensuite, respectivement ajoutés en α(1,3) et α(1,6) sur le mannose du Man-$GlcNAc_2$-PP-Dol. Ces réactions, bien que différentes, sont réalisées par la même enzyme appelée ALG2. Par la suite, l'ALG11 va pouvoir, dans un premier temps, ajouter un mannose liés en α(1,2) sur l'α(1,3)-mannose, puis, dans un second temps ajouter un deuxième mannose liés en α(1,2)sur l'α(1,2)-mannose. Ceci aboutit à la formation d'une antenne appelée antenne « a » (Cipollo et al., 2001) **(*Figure 4*)**. La formation de ce $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol termine également la synthèse du précurseur oligosaccharidique sur la face cytosolique du RE **(*Figure 4A et B*)**.

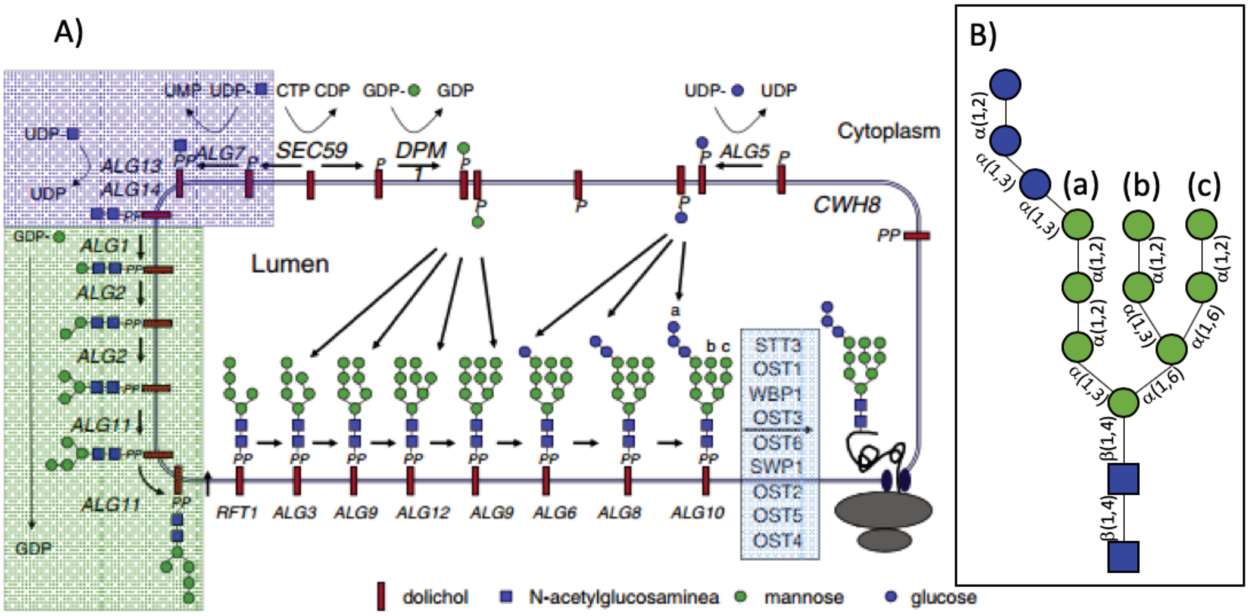


Figure 4 : Biosynthèse du précurseur oligosaccharidique $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol d'après (Aebi, 2013).

A) Le *schéma résume les étapes initiales de la N-glycosylation prenant place sur les faces cytosolique et luminale du RE. Ce processus est catalysé par différentes glycosyltransférases spécifiques nommées ALG (Asparagine Linked Glycosylation) permettant l'ajout de résidus N-acétylglucosamine, de résidus mannose et glucose sur l'ancre lipidique dolichol. La formation du précurseur commence sur la face cytosolique du RE par l'action du complexe enzymatique regroupant les ALG7, 13 et 14 (encadré bleu), suivie par le complexe enzymatique regroupant les ALG1, 2 et 11 (encadré vert). Après l'action de la flippase RFT1, des mannoses et glucoses sont rajoutés dans la lumière du RE par les ALG3, 9, 12, 6, 8 et 10 avant que l'oligosaccharyltransférase (encadré bleu clair), transfère le précurseur sur une protéine en cours de synthèse. B) Détail de la structure du précurseur, avec les différentes liaisons en jeu dans les antennes « a », « b » et « c ».*

2) Synthèse luminale

Après la formation du $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol sur la face cytosolique, la synthèse du précurseur va se poursuivre sur la face luminale du RE par l'ajout de quatre nouveaux résidus mannose ainsi que trois glucoses (Glc). Cependant, avant que toutes ces opérations puissent être effectuées, il est impératif que le $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol passe la membrane du RE pour se retrouver du côté de la lumière du RE. Le précurseur glycannique en formation est, alors, transloqué grâce à l'action d'une flippase nommée RFT1 (Helenius et al., 2002)**(*Figure 4A*)**.

Les glycosyltransférases présentes coté luminale nécessitent également des substrats différents des nucléotides sucres, en effet, à l'intérieur du RE, le mannose et le glucose nécessaires à la synthèse du précurseur final seront utilisés sous forme de Dol-P-Man et Dol-P-Glc. La conversion des nucléotides sucres en Dol-P-sucres s'effectue au niveau de la membrane du RE côté cytosolique. Dans le cas du mannose, l'UDP-mannose est pris en charge par une DPM1 qui va former le Dol-P-Man. Pour le glucose, c'est l'ALG5 qui va former le Dol-P-Glc à partir de l'UDP-Glucose (Heesen et al., 1994). Une flippase va alors permettre au Dol-P-Man et Dol-P-Glc de se transloquer sur la face luminale du RE **(*Figure 4A*)**.

Le premier mannose ajouté dans la lumière du RE est transféré en α(1,3) sur le α(1,6)-mannose du complexe $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol. Cette réaction catalysée par l'ALG3 et directement succédée par le transfert d'un nouveau résidu mannose en α(1,2) par l'ALG9 sur le mannose tout juste ajouté par ALG3 formant ainsi un $Man_7GlcNAc_2$-PP-Dol (Frank and Aebi, 2005). L'action successive de ces deux enzymes permet la mise en place d'une nouvelle antenne appelée antenne « b ». Une α(1,6)-mannosyltransférase va alors transférer un second mannose sur l'α(1,6)-mannose du core mannose avec une liaison en α(1,6) catalysée par l'ALG12 (Chantret et al., 2002). Ensuite, de même que pour le mannose précédent, l'ALG9 va greffer un nouveau mannose en α(1,2). Cette deuxième intervention de l'ALG9 met ainsi en place la dernière antenne du motif glycannique appelée antenne « c » **(*Figure 4A et B*)**.

L'ajout de trois glucoses sur l'antenne « a » va ensuite être effectuée pour parvenir au précurseur oligosaccharidique complet. Le premier glucose est transféré en α(1,3) sur le dernier mannose de l'antenne « a » par l'action d'une α(1,3)-glucosyltransférase nommée ALG6. L'ALG8 va greffer un second glucose en α(1,3). Finalement, l'ALG10 va à son tour

transférer un autre résidu glucose en α(1,2), donnant ainsi naissance au précurseur complet $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol (Burda and Aebi, 1998).

3) Oligosaccharyltransférase (OST)

Une fois le précurseur $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol synthétisé, le glycanne va être transféré sur une protéine néosynthétisée par l'action d'un complexe enzymatique appelé oligosaccharyltransférase (OST). L'OST est un complexe protéique hétéro-oligomérique constitué de 7 à 8 unités différentes nommées respectivement OST1, OST2, OST3/OST6p, OST4p, OST5p, STT3p, Wbp1p, et Swp1p chez les levures et ribophorine I, DAD1, N33/IAP, OST4, STT3A/STT3B, OST48, ribophorine II chez les mammifères (Kelleher and Gilmore, 2006).

La sous-unité STT3 est la plus conservée parmi les eucaryotes de toutes les sous-unités du complexe de l'OST. Il a été démontré que cette sous-unité est celle qui possède l'activité catalytique de liaison du glycanne sur l'asparagine (Kelleher and Gilmore, 2006). Ces résultats ont notamment été supportés par le fait que certains organismes protozoaires effectuait leur *N*-glycosylation par la seule présence d'une molécule transmembranaire homologue à la sous-unité STT3. A titre d'exemple, il a été démontré chez *Trypanosoma brucei* que trois protéines homologues à STT3 étaient présentes et suffisaient pour transférer le *N*-glycanne sur la protéine (Samuelson et al., 2005).

Chez les eucaryotes supérieurs comme les mammifères et les plantes, cette sous-unité existe sous deux formes, STT3A et STT3B. Ces deux formes permettent la formation de deux complexes distincts, qui n'ont pas la même activité catalytique et ont une sélectivité différente vis-à-vis du substrat glycannique (Kelleher et al., 2003). D'après les recherches effectuées sur ces deux complexes, il a été montré que la sous-unité STT3A serait impliquée dans le transfert co-traductionnel du *N*-glycanne sur la protéine, alors que celui de STT3B s'occuperait de greffer le *N*-glycanne sur les protéines après leur traduction. Il a également été montré que ces deux OSTs peuvent travailler de manière complémentaire (Ruiz-Canada et al., 2009).

Pour ce qui est des autres sous-unités, certaines ont un rôle dans la structure du complexe de l'OST, ce qui est notamment le cas pour la sous-unité OST4 dont plus de 50% de la séquence est transmembranaire, et permet de stabiliser les autres sous-unités du complexe (Dumax-Vorzet et al., 2013).

Le motif $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ va ainsi être transféré sur la protéine au cours de sa synthèse dans le RE grâce à l'interaction entre l'OST et le complexe de translocation sec61 du ribosome (Chavan et al., 2005). Le transfert de l'oligosaccharide débute par la reconnaissance du glycanne grâce au glucose terminal liée en α(1,2) sur l'oligosaccharide. L'absence de ce glucose terminal a montré une réduction, de manière importante, de la reconnaissance du substrat par l'OST diminuant, en même temps, le processus de *N*-glycosylation des protéines (Karaoglu et al., 2001). L'OST va ensuite greffer l'oligosaccharide précurseur sur un groupement amine d'une asparagine spécifique appartenant à une séquence polypeptidique consensus de type Asparagine-X-sérine (Asn-X-Ser) ou Thréonine (Thr), où X peut être représenté ici par n'importe quel acide aminé hormis la proline. Dans de plus rare cas, il a également été observé que le motif glycannique pouvait se greffer sur la séquence Asparagine-X-Cystéine (Asn-X-Cys) (Sato et al., 2000). Des tests *in vitro* ont pu montrer que l'affinité du glycanne pour la séquence Asn-X-Thr était quatre fois plus importante que celle du motif Asn-X-Ser elle-même plus forte que le motif Asn-X-Cys (Cherepanova et al., 2016). Il a, cependant, été remarqué que la présence de ces sites consensus ne suffisait pas pour que le transfert puisse se faire. En effet, le transfert du glycanne serait facilité dans les zones peptidiques induisant des changements conformationnels ainsi que la stabilisation de la structure tridimensionnelle de la protéine (Petrescu et al., 2004).

4) Contrôle qualité

Afin de s'assurer que la glycoprotéine est bien repliée, une étape importante de contrôle qualité est effectuée dans le RE. Dans un premier temps, à l'instant même où l'oligosaccharide a été transféré sur l'asparagine de la protéine, le glucose terminal lié en α(1,2) est clivé par l'α-glucosidase I (GS I), une protéine transmembranaire dont le site catalytique est orienté vers le lumen du RE (Tannous et al., 2015). Le $Glc_2Man_9GlcNAc_2$ produit sur la protéine est un intermédiaire avec une durée de vie très courte dont la présence a longtemps été mal compris. Pourtant, des recherches effectuées par Galli et collaborateurs, en 2011, ont identifié que cet intermédiaire réagirait spécifiquement avec une malectine qui aurait un rôle dans le dépistage précoce de protéines mal repliées (Galli et al., 2011). En général, l'intermédiaire $Glc_2Man_9GlcNAc_2$-Asn est pris en charge par l'α-glucosidase II (GS II), un hétérodimère composé de deux sous-unités GIIα et GIIβ, qui va retirer le premier glucose lié en α(1,3) de la glycoprotéine. Le motif $Glc_1Man_9GlcNAc_2$-Asn est aussitôt reconnue par deux lectines

chaperonnes du RE nommées Calnexine et Calréticuline (CNX/CRT) **(*Figure 5*)**. Ces deux lectines vont par la suite recruter l'oxydoréductase ERp57 et la peptidyl-prolyl isomérase CypB qui vont toutes deux assurer les étapes de formation des ponts disulfures permettant le repliement de la glycoprotéine (Vinaik et al., 2013).

Une fois la glycoprotéine détachée des lectines, la GS II s'occupe de cliver le dernier glucose restant, afin d'éviter toute nouvelle interaction avec les deux molécules chaperonnes CNX ou CRT. A cet instant, les glycoprotéines obtenues correctement repliées peuvent continuer leur chemin vers l'appareil de Golgi, les autres restent dans le RE afin d'optimiser encore leurs repliements. Cette activité nécessitant la capacité de distinguer une glycoprotéine correctement ou incorrectement repliée est effectuée par une UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT) ou UGT1 (Sousa et al., 1992; Caramelo et al., 2004). Une fois que l'UGT1 décèle un défaut de repliement dans une glycoprotéine, elle transfère un nouveau glucose sur l'antenne « a » du motif glycannique, entrainant ainsi de nouveau sa reconnaissance par le complexe CNX/CRT et la modification de sa structure tridimensionnelle sous l'assistance des deux protéines CypB et ERp57 (Jansen et al., 2012). Plusieurs étapes de dé-glucosylation et re-glucosylation interviennent alors afin de replier au mieux les glycoprotéines et éviter la sécrétion de protéines aberrantes **(*Figure 5*)**.

Le processus permettant l'arrêt des cycles de dé-glucosylation/re-glucosylation n'est, actuellement, pas encore bien compris. Il semblerait, néanmoins, qu'une α(1,2)-mannosidase (ER-Man) retire un α(1,2) de l'antenne « b » afin de generer un $Man_8GlcNAc_2$ (Benyair et al., 2015). Si les protéines ne sont toujours pas bien repliées, la lyse par une endomannosidase des mannoses liés en α(1,2) dont ceux de l'antenne « c » soit impliquée dans l'arrêt de ce processus. La perte des mannoses en α(1,2) va avoir, dans un premier temps, pour conséquence de diminuer l'affinité de UGT1 au *N*-glycanne. Dans un deuxième temps, l'α(1,2)-mannose de l'antenne « c » clivé expose un α(1,6)-mannose reconnu par les lectines OS-9 et XTP3-B ciblant ainsi ces glycoprotéines en vue de leurs destructions dans le protéasome par les enzymes de la voie ERAD (ER-associated degradation) (Aebi et al., 2010).

Les glycoprotéines déglucosylées convenablement repliées vont, quant à elles, être transportées par transport vésiculaire jusque dans l'appareil de Golgi où des modifications supplémentaires vont pouvoir être effectuées. Ce transport est facilité par des lectines (VIPL,

ERGIC-53 et VIP36) qui reconnaissent notamment avec une grande affinité les motifs avec 8 ou 9 mannoses (Kamiya et al., 2008) **(*Figure 5*)**.

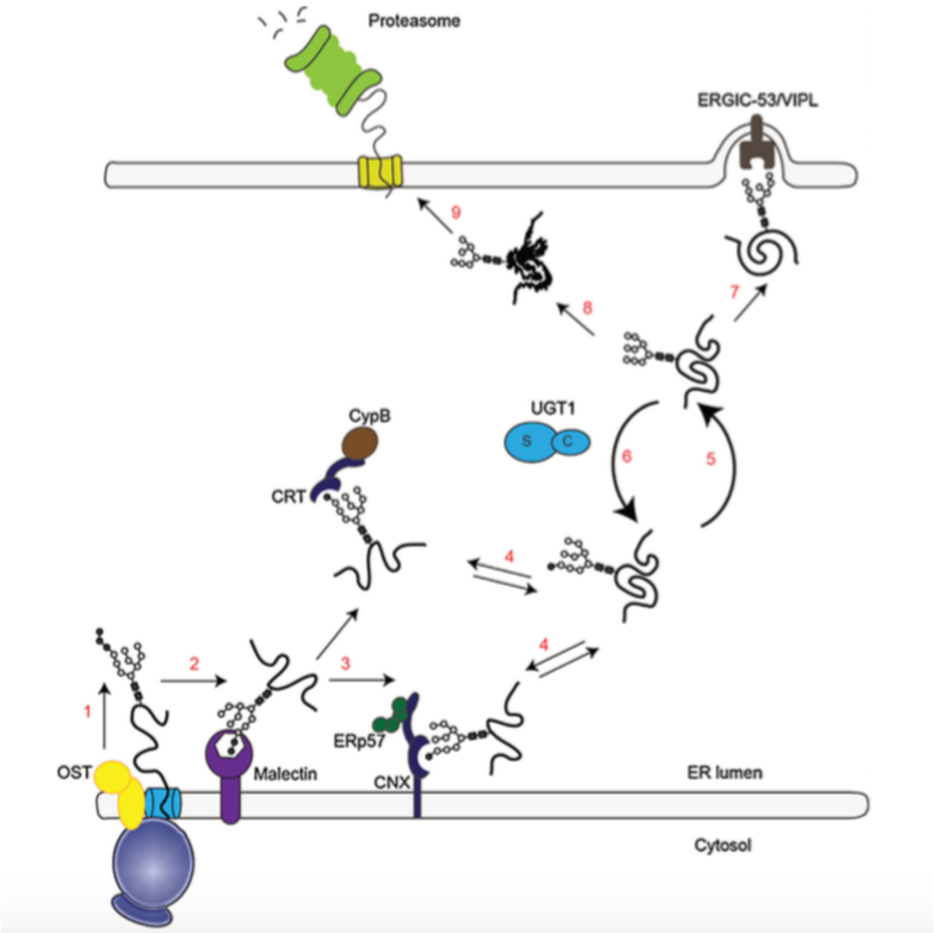


Figure 5 : Etapes du contrôle qualité des protéines N-glycosylées au sein du RE (Tannous et al., 2015).

Après le transfert du glycanne sur la protéine par l'oligosaccharyltransférase (OST) (1), le contrôle qualité des glycoprotéines débute suite à l'identification par la malectine des protéines mal repliées (2). Deux lectines, la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT), vont s'appareiller à ces protéines permettant à l'oxydoréductase ERp57 et la peptidyl-prolyl isomérase CypB d'effectuer les ponts disulfures nécessaires au bon repliement des glycoprotéines (3 et 4). L'UGT1 (UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase) s'occupe alors de vérifier si les protéines sont correctement repliées avant, soit de les renvoyer au contrôle qualité (6), soit de les envoyer vers l'appareil de Golgi (5), ou encore, de les envoyer vers le protéasome pour destruction (8 et 9).

B) Modifications dans l'appareil de Golgi

Une fois que les glycoprotéines ont passé avec succès le contrôle qualité, elles sont acheminées par transport vésiculaire jusque dans l'appareil de Golgi, où les *N*-glycannes subissent des modifications dans le but d'acquérir leurs formes matures. Contrairement aux étapes du RE, les étapes prenant place au sein de l'appareil de Golgi connaissent de grandes différences selon les espèces. Cette diversité donne ainsi lieu à la synthèse de motifs glycanniques très variés selon les organismes.

1) *N*-glycannes de mammifères

Chez les mammifères, les *N*-glycannes complexes synthétisés dans l'appareil de Golgi peuvent exister sous différents degrés de ramification, allant de bi- à tetra-antennée. Dans un premier temps, la glycoprotéine portant jusqu'alors un $Man_8GlcNAc_2$, subit une dé-mannosylation sous l'action de l'⍰-mannosidase I (Man I). Cette enzyme va retirer les mannoses liés en $\alpha(1,2)$ sur l'oligosaccharide, aboutissant ainsi à la formation de motifs allant de huit mannoses (Man-8) jusqu'à cinq mannoses (Man-5), le glycanne Man-5 étant le motif souhaité pour la suite des modifications. Ensuite, une enzyme appelée *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I) va pouvoir ajouter un groupement GlcNAc lié en ⍰(1,2) sur le mannose lié en $\alpha(1,3)$ du core glycannique, permettant l'entrée dans la synthèse des glycannes dit complexes. Le $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$-Asn ainsi formé va alors subir une nouvelle étape de dé-mannosylation par le biais de l'⍰-mannosidase II (Man II) qui retire successivement les mannoses liés en $\alpha(1,3)$ et $\alpha(1,6)$, formant, respectivement, l'antenne « b » et « c », pour aboutir à un $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$-Asn. Une *N*-acétylglucosaminyltransférase II (GnT II) va alors accéder au mannose lié en $\alpha(1,6)$ du core et y greffer un GlcNAc supplémentaire lié en ⍰⍰1,2) à partir d'un substrat donneur UDP-GlcNAc. Le glycanne $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$-Asn ainsi formé représente le core glycannique retrouvé dans la plupart des eucaryotes **(*Figure 6*)**.

La maturation des glycannes complexes chez les mammifères consiste ensuite à ajouter des unités galactoses en $\beta(1,4)$ sur les deux GlcNAc terminales. Cette opération dirigée par une $\beta(1,4)$-galactosyltransférase (GalT) aboutit à un $Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$. L'ajout d'acides sialiques peut ensuite être effectué sur les galactoses par l'action de deux sialyltransférases transférant, respectivement, soit un acide sialique en $\alpha(2,3)$ soit un acide sialique en $\alpha(2,6)$ sur les galactoses terminaux à partir de cytosine monophosphate-acide sialique (CMP-Sia).

D'autres modifications peuvent être observées, comme l'ajout d'autres résidus GlcNAc sur les mannoses $\alpha(1,3)$ et $\alpha(1,6)$ par deux *N*-acétylglucosaminyltransférases différentes (GnT IV et GnT V), ainsi que le transfert d'un résidus GlcNAc sur le mannose du core, appelé GlcNAc bissectrice, par l'action de la GnT III **(*Figure 6*)**. L'action de ces GnTs va permettre d'aboutir à la formation des motifs tri-antennés et tetra-antennés, pouvant aussi être complétés par des

additions de β(1,4)-galactoses et d'acides sialiques comme pour les autres antennes (Donadio-Andréi et al., 2012).

Une dernière étape de maturation consiste à transférer un fucose en α(1,6) sur la GlcNAc proximale du groupement chitobiose par l'α(1,6)-fucosyltransférase (FuT8). La présence de ce fucose joue, par exemple, un rôle important dans l'adhésion de la glycoprotéine aux leucocytes (Sturla et al., 2005) **(*Figure 6*)**.

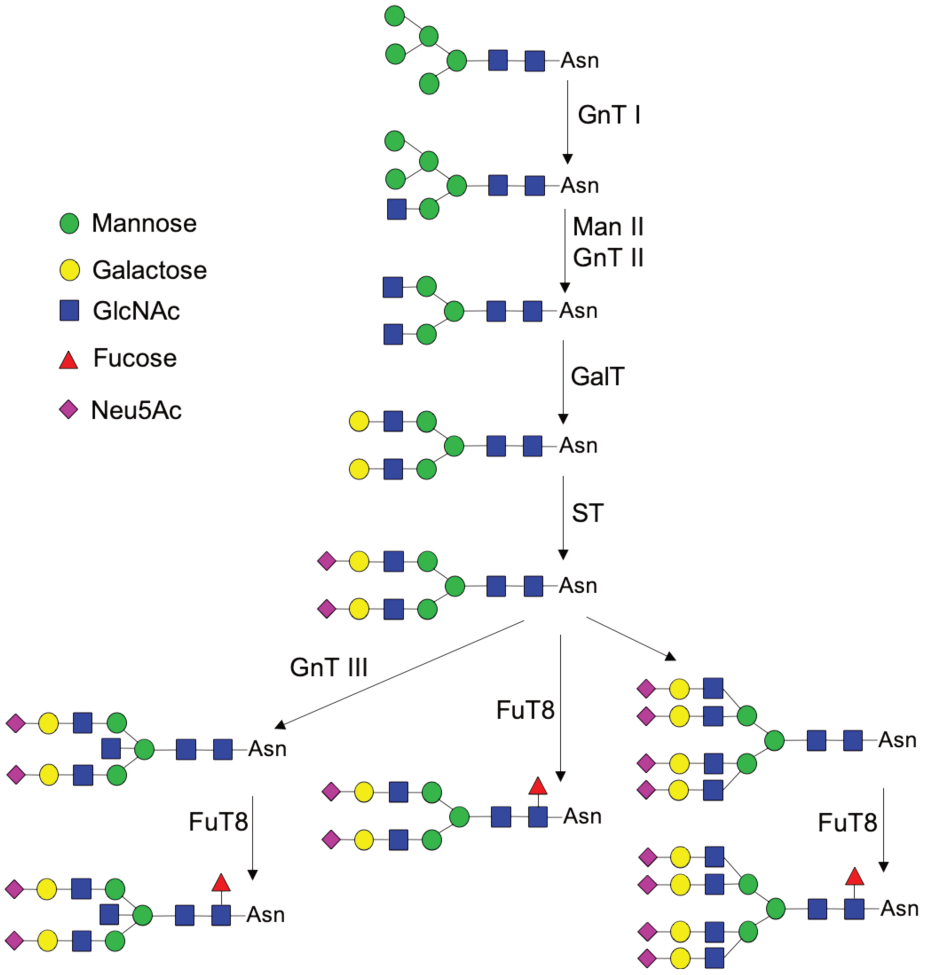


***Figure 6 : Schéma résumant les grandes étapes de synthèse des N-glycannes complexes dans l'appareil de Golgi humain d'après* (Donadio-Andréi et al., 2012).**

La figure résume la synthèse des N-glycannes complexes chez les mammifères. Après l'action de l'α-mannosidase I (Man I) sur le $Man_9GlcNAc_2$, le $Man_5GlcNAc_2$ est pris en charge par la N-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I) et forme le $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$ permettant d'ouvrir la voie à la formation des glycannes complexes. Par la suite, l'α-mannosidase II (Man II), la N-acétylglucosaminyltransférase II (GnT II), l'α(1,6)-fucosyltransférase (FUT8), la β(1,4)-galactosyltransférase (GalT) et les α(2,3) et α(2,6)-sialyltransférases (ST) vont pouvoir modifier le N-glycanne. D'autres enzymes comme les N-acétylglucosaminyltransférases III, IV et V (GnTIII, IV et V) peuvent aussi transférer des N-acétylglucosamines pour permettre la formation des N-glycannes tri- et tetra-antennés, respectivement. Asn : asparagine.

2) *N*-glycannes de levures

L'étude de la *N*-glycosylation chez les levures a été effectuée chez de nombreuses espèces dont l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae.* Les résultats ont montré que ces organismes étaient capables de synthétiser au sein du RE un précurseur glycannique identique à la majorité des eucaryotes avec trois glucoses, neuf mannoses et deux résidus GlcNAc. La liaison de ce précurseur sur l'asparagine des protéines *via* l'OST va alors permettre le transport vers l'appareil de Golgi de glycoprotéines possédant des *N*-glycannes de type $Man_8GlcNAc_2$ par retrait des trois glucoses et d'un mannose, à l'exception des espèces *Schizosaccharomyces pombe* et *Kluyveromyces lactis* pour lesquelles la glycoprotéine associée à un *N*-glycanne de type $Man_9GlcNAc_2$ est transférée (Pourcq et al., 2010).

Dans la majorité des cas, les levures produisent dans l'appareil de Golgi des motifs glycanniques bien différents de ceux présents chez les mammifères. Tout d'abord, les levures ne réduisent pas les mannoses sur le motif glycannique comme le font les mammifères, ce qui implique au minimum la présence de la forme $Man_8GlcNAc_2$. De plus, des glycosyltransférases vont permettre l'ajout de nombreux mannoses et mannoses phosphates aboutissant à des *N*-glycannes type hyperglycosyl pouvant ainsi posséder jusqu'à plus de cent résidus mannoses. Deux structures glycanniques sont majoritairement présentent chez *S. cerevisiae*, les *N*-glycannes dits de type « core » qui sont les *N*-glycannes présents sur les glycoprotéines des compartiments internes et ont un faible degré de polymérisation, et les *N*-glycannes de type hyperglycosyl, constituant des protéines pariétales et des glycoprotéines du périplasme, qui ont des compositions dépassant les 15 résidus mannose (Munro, 2001).

Pour les *N*-glycannes de type hyperglycosyl, les modifications débutent par l'action d'une α(1,6)-mannosyltransférases appelée Och1p, catalysant l'ajout d'un premier mannose en α(1,6) sur le résidu α(1,3)-mannose du core du $Man_8GlcNAc_2$ **(*Figure 7*)**. L'élongation va ensuite être effectuée par l'action de deux complexes protéiques distincts. Le premier complexe, appelé mannane polymérase I (M-Pol-I), est constitué des sous-unités Mnn9p et Van1p, et va procéder à l'ajout successif de 10 à 15 résidus α(1,6)-mannoses (Stolz and Munro, 2002). L'élongation va, alors, se poursuivre grâce au deuxième complexe, le mannane polymérase II (M-Pol-II), constitué de cinq sous-unités (Mnn9p, Anp1p, Mnn10p, Mnn11p, Hoc1p), ajoutant à lui seul jusqu'à une centaine de résidus mannose liés en α(1,6). La longue chaîne d'α(1,6)-mannoses produite est, par la suite, doublement modifiée. Effectivement,

dans un premier temps, l'action des Mnn2p et Mnn5p (Rayner and Munro, 1998) permet l'ajout d'α(1,2)-mannoses, puis, dans un second temps, Mnn4p et Mnn6p (Nakayama et al., 1998; Odani et al., 1997) vont permettre l'ajout de résidus mannosylphosphates. Pour finir, des α(1,3)-mannoses sont greffés sur les mannoses récemment ajoutés en α(1,2)-mannoses par l'action de la Mnn1p.

Les *N*-glycannes de type core n'ont, quant à eux, qu'un nombre très limité de mannoses comparés aux motifs de type hyperglycosyl. Après l'ajout du α(1,6)-mannose par Och1, une α(1,2)-mannosyltransférase inconnue jusqu'à présent va empêcher l'action de la mannane polymérase I en ajoutant un résidu α(1,2)-mannose sur l'α(1,6)-mannose ajouté par Och1. Les mannosyltransférases Mnn4 et Mnn6 vont, alors, directement ajouter un mannose phosphate, suivis par l'action de Mnn1 qui greffera finalement les α(1,3)-mannoses **(*Figure 7*)**.

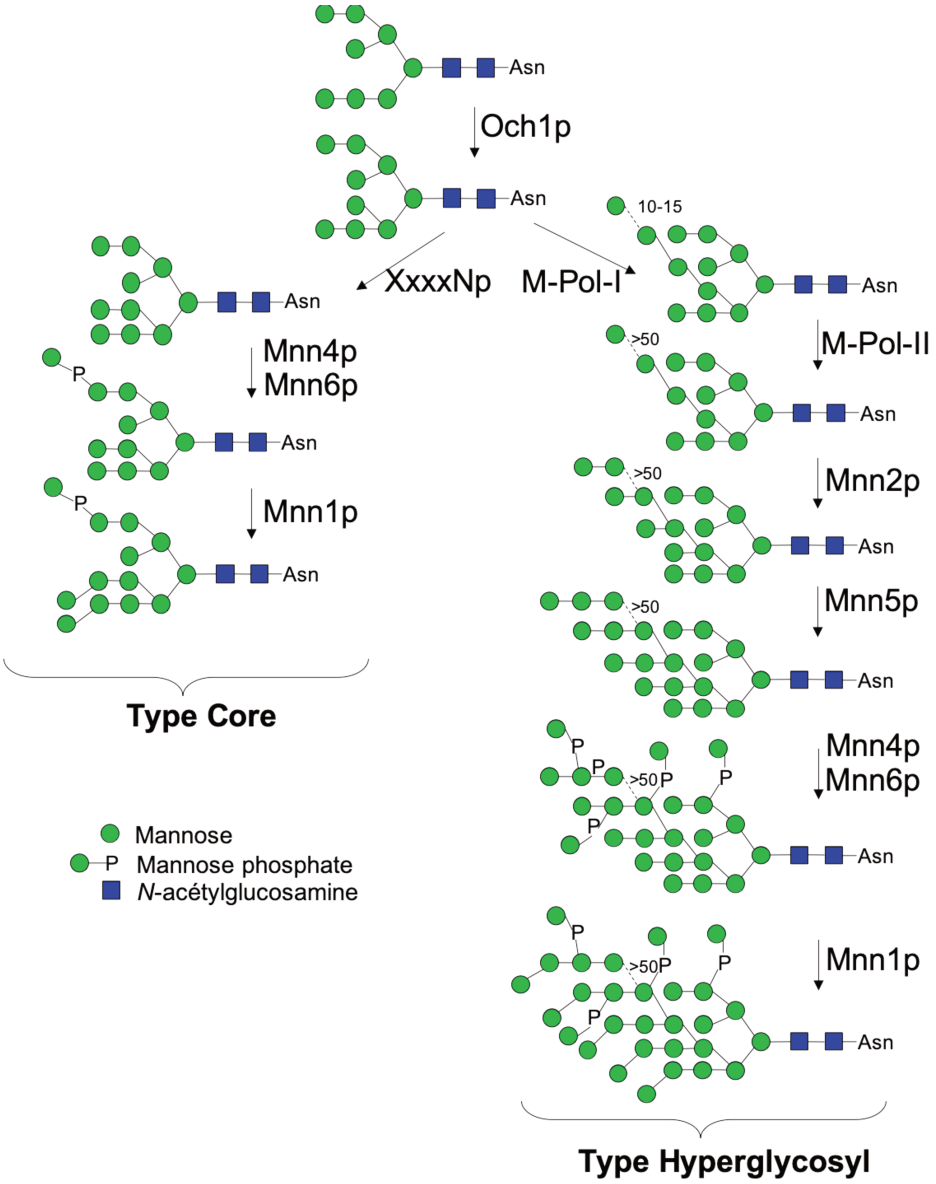


Figure 7 : La maturation des N-glycannes de levure dans l'appareil de Golgi d'après Pourcq et al., 2010.

La figure résume les différentes étapes de glycosylation opérées pour former les N-glycannes dans l'appareil de Golgi de la levure S. cerevisiae. Après l'action de l'α(1,6)-mannosyltransférase (Och1p) sur le $Man_8GlcNAc_2$, les principaux N-glycannes formés se séparent en deux groupes distincts, les N-glycannes de type core, et les N-glycannes de type hyperglycosyl. Les hyperglycosyl sont des structures fortement mannosylés, construites sous l'action des mannanes polymérases I et II (M-Pol-I et II), d'α(1,2)-mannosyltransférases (Mnn2p et Mnn5p), de mannosylphosphates-transférases (Mnn4p et Mnn6p) et d'une α(1,3)-mannosyltransférase (Mnn1p). Les N-glycannes core, avec un degré de mannosylation plus faible, débutent par l'action d'une α(1,2)-mannosyltransférase inconnue (XxxxNp), suivis des mannosylphosphates-transférases (Mnn4p et Mnn6p) et de la α(1,3)-mannosyltransférase (Mnn1p).

3) *N*-glycannes de plantes

Chez les plantes supérieures, le début des modifications golgiennes est identique à celle présente chez les mammifères avec l'intervention d'une α-mannosidase I (α-Man I), clivant les mannoses liés en α(1-2) (Liebminger et al., 2009). La formation des *N*-glycannes

complexes est alors initiée par la GnT I conduisant à un glycanne de type $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$-Asn (Strasser et al., 1999).

Après l'ajout du GlcNAc par la GnT I, comme chez la plupart des organismes eucaryotes, la mannosidase II (Man II) retire les mannoses en α(1,3) et en α(1,6) permettant la formation d'un $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$-Asn directement converti par l'action de la GnT II en $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$-Asn (Bencúr et al., 2005; Munro, 2001). Ce $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$-Asn sera, par la suite, complété par l'addition d'un résidu β(1,2)-xylose, sur le premier mannose du core et d'un α(1,3)-fucose sur la première GlcNAc du motif chitobiose **(*Figure 8*)**.

Chez *A. thaliana*, le β(1,2)-xylose est transféré par une seule enzyme nommée XylT (Bencúr et al., 2005; Strasser et al., 2004). Concernant la fucosylation, deux enzymes modifiant les *N*-glycannes nommées FucT11 et FucT12 ont été identifiées chez *A. thaliana.* Ces deux enzymes sont supposées être la copie d'un seul et même gène conduisant à la modification des *N*-glycannes de manière redondante (Strasser, 2016). Des études ont également montrées que l'ajout, en amont, du β(1,2)-xylose faciliterait la liaison du α(1,3)-fucose (Kaulfürst-Soboll et al., 2011).

La xylosylation et fucosylation des plantes peuvent également prendre une voie alternative, avec l'ajout du β(1,2)-xylose, ainsi que du α(1,3)-fucose directement sur le $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$-Asn. De telles structures sont appelées *N*-glycannes hybrides **(*Figure 8*)**.

La dernière modification golgienne connue chez les plantes est la formation de l'épitope Lewis^a (Lerouge et al., 1998). Dans un premier temps, une β(1,3)-galactosyltransférase (GalT) va ajouter des résidus galactose liés en β(1,3) sur les deux GlcNAcs terminales du glycanne $GlcNAc_2Man_3XylFucGlcNAc_2$. Dans un second temps, une α(1,4)-fucosyltransférase va permettre l'ajout d'un α(1,4)-fucose sur chacune des deux dernières GlcNAcs complétant ainsi la synthèse des glycannes de Lewis^a (Strasser et al., 2007b).

Chez les plantes, certaines études ont également montré que des modifications post-golgiennes pouvaient intervenir, par exemple, sur les glycoprotéines stockées dans la vacuole. Les espèces glycanniques formées, à la suite de ces modifications, sont communément appellées glycannes paucimannosidiques $Man_3FucXylGlcNAc_2$. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana,* des enzymes sont capables de retirer specifiquement les résidus GlcNAc lors du

stockage de la glycoprotéine dans la vacuole. Parmi les enzymes impliquées dans ce processus, deux enzymes ayant une activité β-*N*-acétylhexosaminidase, HEXO1 et HEXO3 ont été identifiées comme responsables de la formation des glycannes paucimannosidiques (Liebminger et al., 2011). HEXO1 est une enzyme présente dans la vacuole alors que HEXO3 est une enzyme présente dans la membrane plasmique s'occupant ainsi de cliver les résidus GlcNAc des glycoprotéines en sécrétion (Strasser et al., 2007a).

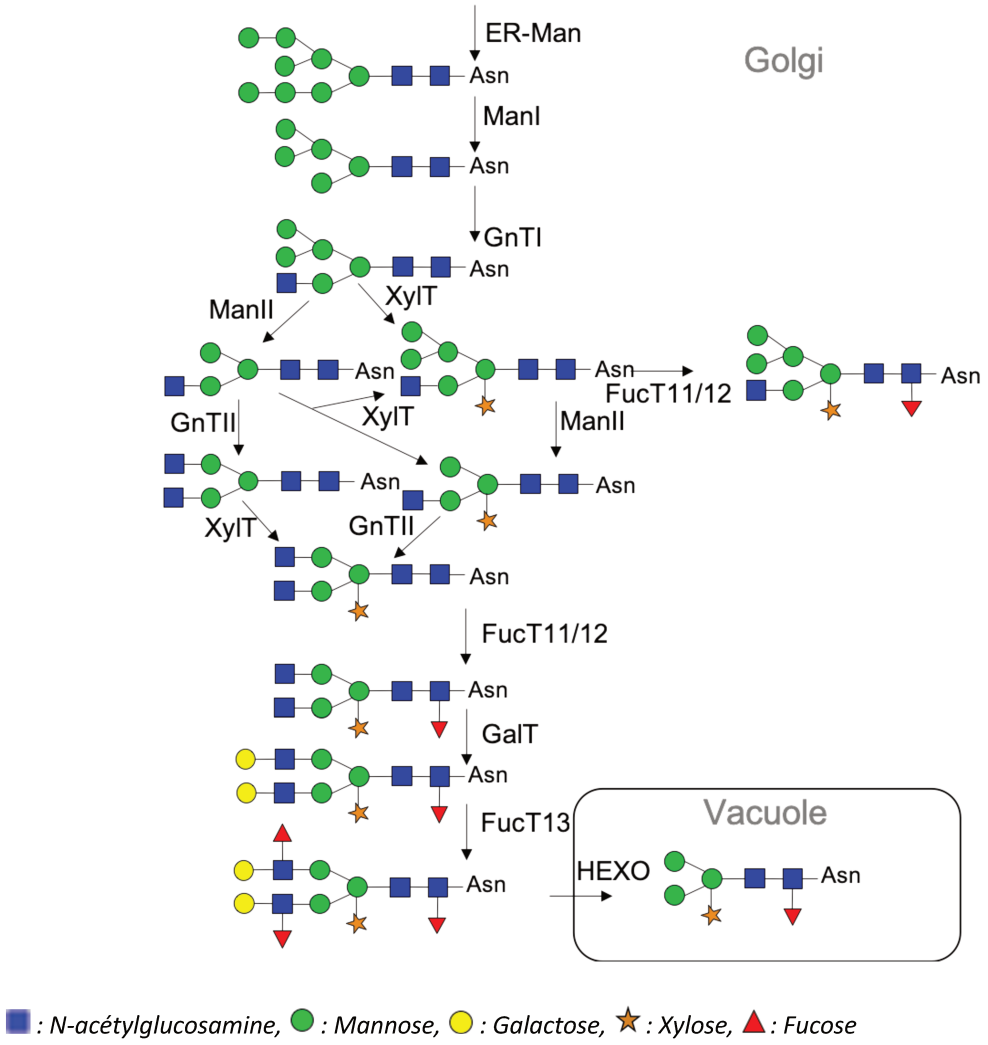


Figure 8 : Maturation des N-glycannes de plantes au sein de l'appareil de Golgi d'après (Strasser, 2016).

Schéma représentant les différents N-glycannes complexes de plantes : N-glycannes hybrides $GlcNAcMan_5XylFucGlcNAc_2$, N-glycannes portant l'épitope Lewis^a $Gal_2(Fuc_2)GlcNAc_2Man_3XylFucGlcNAc_2$, et N-glycannes paucimannosidiques $Man_3FucXylGlcNAc_2$ formés dans la vacuole. Mannosidase du réticulum endoplasmique :ER-Man, Mannosidase I et II : ManI et II, N-acétylglucosaminyltransférase I et II (GnT et II), β(1,2)-xylosyltransférase :XylT, α(1,3)-fucosyltransférase : FucT11/12, galactosyltransférase : GalT, α(1,4)-fucosyltransférase : FucT13, β-N-acétylhexosaminidase (HEXO).

C) Autres formes de *N*-glycosylation : les parasites

Bien que la *N*-glycosylation soit en générale un processus très conservé parmi les eucaryotes, il existe certaines espèces pour lesquelles la mise en forme des motifs glycanniques, notamment, lors des étapes ayant lieu dans le RE, sont très différentes des voies généralement proposées. En effet, même si la *N*-glycosylation a longtemps été proposée comme un évènement majeur n'apparaissant que chez les organismes eucaryotes, il a récemment été montré que certaines espèces procaryotes étaient également capables de synthétiser des motifs *N*-glycanniques à la surface de leurs protéines.

Chez certains parasites du rang des Apicomplexés, comme les espèces *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*, il a été remarqué que les voies de synthèse des glycannes précurseurs dans le RE étaient différentes de celles jusqu'alors supposées être conservées (Garénaux et al., 2008; Schiller et al., 2012; Samuelson and Robbins, 2015). En effet, chez ces espèces, les études portant sur la synthèse du précurseur glycannique lié au dolichol dans le RE ont montré certaines divergences vis-à-vis de la composition du glycanne précurseur. De plus, l'analyse des données génomiques du parasite *T. gondii* a montré que des séquences orthologues aux gènes ALG3, ALG9 et ALG12 étaient absentes (Garénaux et al., 2008). Les protéines codées par ces trois gènes sont importantes pour la synthèse du précurseur oligosaccharidique, car ce sont elles qui régissent la formation des antennes « b » et « c » du motif $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Des travaux plus récents ont proposé que le glycanne précurseur complet de cet organisme serait un $Gl_3Man_5GlcNAc_2$ ce qui est cohérent avec le manque des ALG3, 9 et 12 **(*Figure 9*)**. Garénaux et collaborateurs ont pu démontrer biochimiquement, en 2008, que *T. gondii* possédait non seulement un glycanne précurseur incomplet de type $Gl_3Man_5GlcNAc_2$, mais était également capable de porter sur ses glycoprotéines un glycanne complet $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Il a ainsi été mis en évidence que le $Gl_3Man_5GlcNAc_2$ était le précurseur synthétisé par *T. gondii,* alors que le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ était une forme détournée de la synthèse des précurseurs de son hôte.

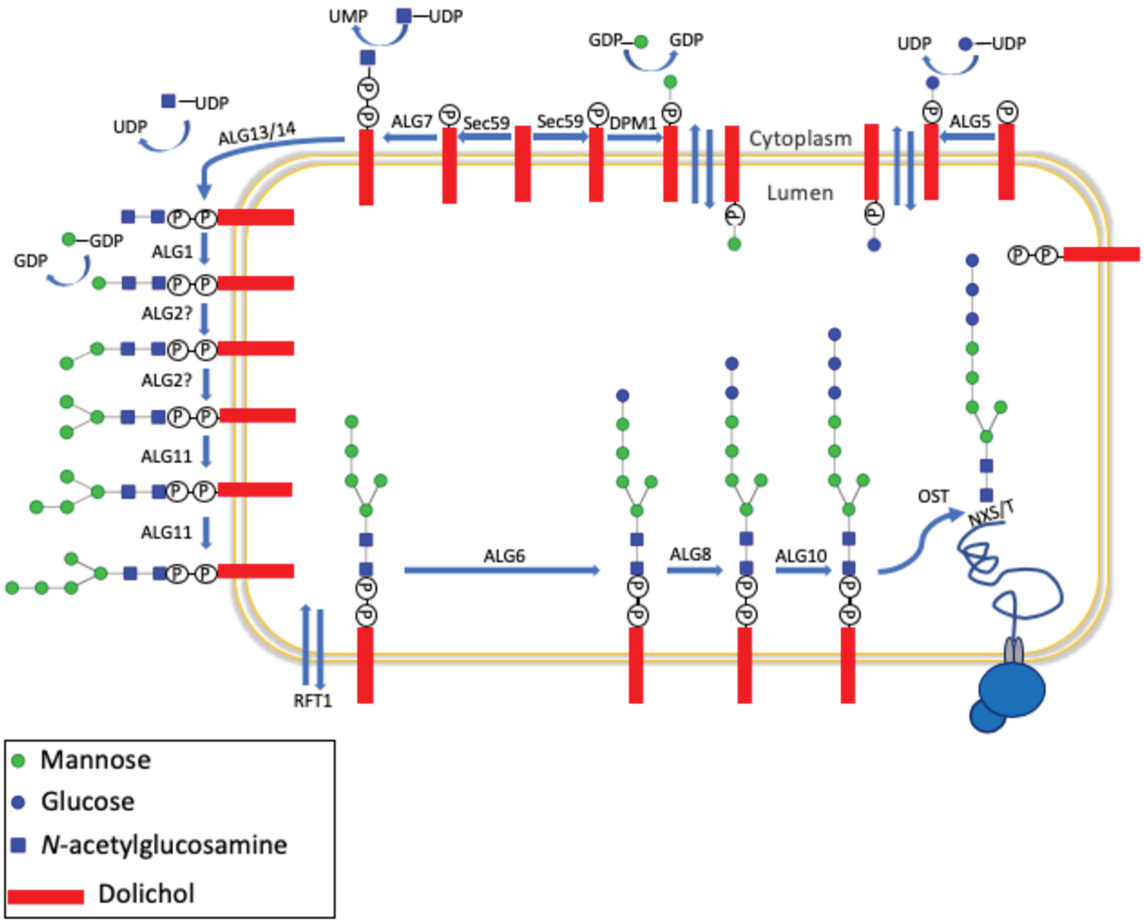


Figure 9 : Biosynthèse du N-glycanne précurseur chez T. gondii d'après (Garénaux et al., 2008).

Résumé des étapes de la synthèse du précurseur glycannique chez T. gondi dans le RE. L'action des ALG (Asparagine linked glycosylation) aboutit à la synthèse d'un précurseur glycannique $Glc_3Man_5GlcNAc_2$, différent de celui présent dans la plupart des eucaryotes. Ce précurseur tronqué est ensuite transferé sur l'asparagine du site consensus asparagine-X-Serine/thréonine (NXS/T), où X peut être n'importe quel acide aminé sauf la proline, par l'oligosaccharyltransférase (OST). UDP : uridine diphosphate, UMP : uridine monophosphate, GDP : Guanosine diphosphate, RFT1 : flippase.

D) Transporteurs de nucléotides-sucres

Chez les eucaryotes, les processus de maturation des motifs de glycosylation opérés dans l'appareil de Golgi ne peuvent être effectués sans le passage des nucléotides sucres au travers de la membrane de l'organite. En effet, tous ces nucléotides sucres sont synthétisés à partir du glucose dans le cytosol, à l'exception du CMP-acide sialique synthétisé dans le noyau (Kean et al., 2004), et ne peuvent pas traverser passivement la membrane de l'appareil de Golgi. L'introduction de ces nucléotides sucres dans l'appareil de Golgi se fait grâce à l'intervention de protéines appelées transporteurs de nucléotides sucres (NSTs) qui sont, donc, essentielles pour le bon déroulement des étapes de glycosylation. Les connaissances actuelles sur les NSTs ne seront pas détaillées dans le cadre de cette synthèse bibliographique.

IV) *O*-Glycosylation des protéines

La *O*-glycosylation, au même titre que la *N*-glycosylation est une modification post-traductionnelle des protéines consistant à lier des glycannes avec une liaison *O*-glycosidique sur des acides aminés spécifiques comme la sérine, la thréonine ou encore l'hydroxyproline (Brockhausen et al., 2009; Nguema-Ona et al., 2014). Contrairement à la *N*-glycosylation, la *O*-glycosylation des protéines est moins étudiée étant donné qu'il n'existe pas d'enzyme universelle capable de cliver tous types de *O*-glycannes (Peter-Katalinić, 2005). Les actuelles connaissances ont montré que les *O*-glycannes des protéines possèdent d'importantes fonctions chez les cellules animales et les cellules de plantes. Parmi les rôles connus, nous pouvons citer, notamment, l'implication dans l'interaction cellule-cellule, la signalisation, la reconnaissance, la structure protéique et également un rôle contre l'adhésion des bactéries (Brockhausen and Stanley, 2015; Takeuchi et al., 2017; van Tol et al., 2019).

Contrairement à la *N*-glycosylation, l'analyse structurale détaillée de la *O*-glycosylation n'est pas actuellement jugée obligatoire par la FDA (Food and Drug Association) dans l'acceptation des protéines recombinantes sur le marché des biomédicaments. Cependant, comme ces structures sont présentes sur les protéines recombinantes et que les motifs de *O*-glycannes sont différents en fonction des espèces, il est fort probable qu'il soit nécessaire dans le futur de modifier cette voie de *O*-glycosylation pour que toutes les glycoprotéines recombinantes possèdent une *O*-glycosylation semblable à celle présente chez l'Homme. Bien qu'il existe multiples formes de *O*-glycosylation, cette partie se focalisera sur les *O*-glycannes présents de manière générale sur les principaux organismes, actuellement, utilisés pour produire des protéines recombinantes.

A) *O*-glycosylation chez les mammifères

La *O*-glycosylation des protéines de mammifères et un processus ajoutant des glycannes sur des thréonines et des sérines de la protéine. Des liaisons plus rares peuvent aussi être observées sur la proline et la tyrosine. Plusieurs formes de *O*-glycosylation sont représentées chez les mammifères, notamment les α-*O*-GalNAcs, les α-*O*-fucoses, les β-*O*-xyloses, les α-*O*-mannoses, les β-*O*-GlcNAcs, les α- ou β-*O*-galactoses, et les α- ou β-*O*-glucoses. Par la suite, ne seront traités que les formes majoritaires, à savoir, les *O*-GalNAcs et les *O*-glycannes de type mucine.

1) *O*-glycannes de type Mucine

La synthèse des *O*-glycannes de type mucine débute au niveau de la saccule *cis* de l'appareil de Golgi par l'ajout d'un résidu GalNAc sur une sérine ou une thréonine pour former un GalNAc-Ser/Thr, également appelé antigène Tn, par l'action d'une polypeptide *N*-acétylglucosaminyltransférase (ppGaNTase) (Bennett et al., 2012) **(*Figure 10*)**. Une étude a montré qu'il existait environ une vingtaine de ppGaNTases différentes chez les mammifères agissant ou non en fonction des précédentes *O*-glycosylations effectuées (Hagen et al., 2003). L'élongation du résidu GalNAc va, ensuite, être opérée par différentes glycosyltransférases localisées dans l'appareil de Golgi aboutissant à plusieurs structures de *O*-glycannes. Ces structures dérivées du *O*-glycanne GalNAc-Ser/Thr sont généralement désignées sous le nom de core. Communément, il existe quatre structures principales, respectivement, nommées core 1 à 4. Quatre structures additionnelles de cores portant les noms de core 5 à 8 existent également, mais, apparaissent de façon plus limitée chez les mammifères (Brockhausen et al., 2009) **(*Figure 10*)**. La première élongation dénommée core 1 est, d'abord, formée par l'ajout d'un résidu galactose sur la GalNAc par une β(1,3)-galactosyltransférase, formant ainsi le galactose-β(1,3)-GalNAc qui est le *O*-glycanne le plus courant (Ju et al., 2002). Le core 2 va être formé, ensuite, sur la base du core 1, où un GlcNAc supplémentaire est greffé sur le résidu GalNAc par une liaison β(1-6). Les *O*-glycannes de type core 2 sont retrouvés très fréquemment dans les mucines et les glycoprotéines d'un grand nombre de cellules et de tissus. Le *O*-glycanne core 3 découle du motif mucine de base GalNAc-Ser/Thr, sur lequel est ajouté un résidu β(1,3)-GlcNAc pour former un GlcNAc-β(1,3)-GalNAc. Pour la formation du *O*-glycanne core 4, de la même manière que pour le core 2, un β(1,3)-GlcNAc est ajouté sur le GalNAc du core 3 et forme un GlcNAc-β(1,3)-GlcNAc-β(1,6)-GalNAc (Robbe et al., 2004). Tous ces cores peuvent, ensuite, être complétés avec différents résidus, comme des galactoses, des GalNAcs, des GlcNAcs, des fucoses ou encore des acides sialiques (Brockhausen, 1995). D'importantes substitutions ont également été remarquées sur ces *O*-glycannes, comme, par exemple, la *O*-acétylation d'acides sialiques et la *O*-sulfation de galactoses et de GlcNAc (Culling et al., 1976; Xia et al., 2005; Tobisawa et al., 2010).

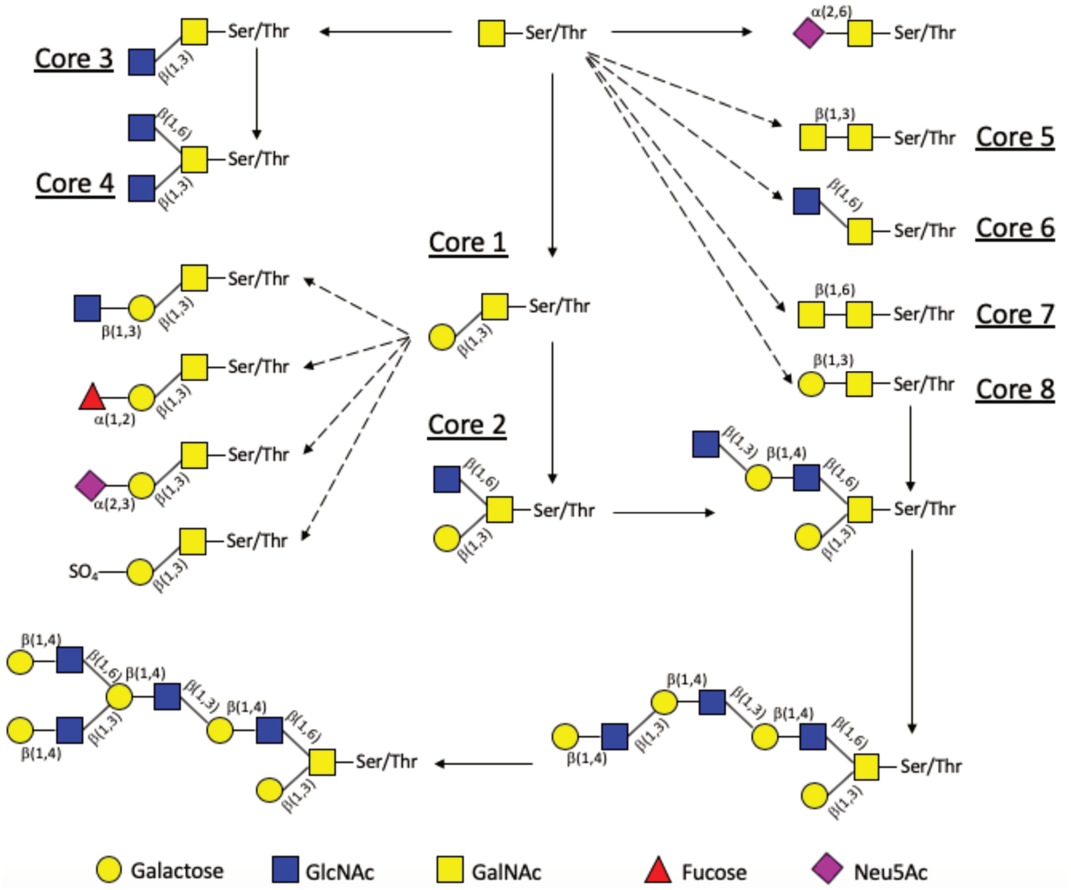


Figure 10 : Représentation des différents cores mucines fréquemment retrouvés chez les mammifères d'après (Gomord et al., 2010).

Résumé de la synthèse des différents cores de O-glycanne de type mucine à partir du GalNAc. Ser/Thr : Sérine/Thréonine.

Chez les mammifères, les glycoprotéines arborant des *O*-glycannes de type mucine sont impliquées dans de nombreux procédés biologiques, comme par exemple la régulation de la durée de demi-vie des cytokines, ou encore la lubrification de certains tissus intestinaux (Brockhausen, 2006).

B) *O*-glycosylation chez les plantes

Chez les plantes, la *O*-glycosylation des protéines a été très étudiée dans une famille spécifique de protéines pariétales secrétées que représentent les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGPs). Ces HRGPs constituent une superfamille de glycoprotéines composée d'arabinogalactane protéines (AGPs) ainsi que des extensines (EXTs). Contrairement aux mammifères où la *O*-glycosylation s'effectue principalement sur la sérine et la thréonine, les *O*-glycannes de plantes se retrouvent majoritairement sur des prolines préalablement converties en hydroxyprolines par l'action de prolines hydroxylases (P4Hs)

dans le RE ainsi que dans l'appareil de Golgi. Ces hydroxyprolines sont ensuite *O*-glycosylées dans l'appareil de Golgi par des enzymes ajoutant des résidus d'arabinose et de galactose formant des motifs bien différents de ceux obtenus chez les mammifères (Nguema-Ona et al., 2014).

1) *O*-glycosylation des AGPs

La synthèse des *O*-glycannes des AGPs s'effectue sur l'hydroxyproline (Hyp) d'une séquence peptidique consensus Hyp-X, où X peut être une alanine, une sérine, une thréonine ou une valine. La *O*-glycosylation est initiée sur cette séquence par l'action d'une galactosyltransférase (*O*-Hyp GalT), qui effectue la liaison entre l'hydroxyproline et le galactose pour former un motif galactose-*O*-Hyp (Basu et al., 2013). Par la suite, plusieurs autres galactosyltransférases vont allonger le *O*-glycanne néoformé en enjouant une succession de galactoses liés en β(1,3) sur le motif galactose-*O*-Hyp (Qu et al., 2008)**(*Figure 11A*)**. Une fois cette chaîne de β(1,3)-galactane formée, différents oses sont ajoutés. Parmi ces modifications, une β(1,6)-galactosyltransférase va initier l'ajout de plusieurs chaînes de β(1,6)-galactose sur le β(1,3)-galactane, ces chaînes de β(1,6)-galactose pouvant, également, être ramifiées par des β(1,3)-galactoses (Geshi et al., 2013). Des α(1,3)- et α(1,5)-arabinoses sont également ajoutés par des arabinosyltransférases sur les β(1,3)- et β(1,6)-galactoses. Les AGPs sont également modifiés par des acides glucuroniques (GlcA), cette action est opérée par une acide glucuronique transférase (GlcAT) capable de transférer un GlcA sur les β(1,6)-galactoses et les β(1,3)-galactoses. L'étude des AGPs d'*A. thaliana* a également montré que des résidus fucose peuvent être présents sur les *O*-glycannes. L'ajout de ces résidus est dû à deux enzymes golgiennes nommées FucT4 et FucT6, permettant le transfert de résidus fucose sur des arabinoses par une liaison α(1,2) (Wu et al., 2010).

2) *O*-glycosylation des EXTs

A la différence des *O*-glycannes des AGPs, les *O*-glycannes présents sur les extensines (EXTs) sont des polymères d'oses relativement courts composés de chaînes d'environ 4 à 5 résidus arabinoses précédés d'un résidu galactose greffé, respectivement, sur des hydroxyprolines et une sérine d'un motif (Ser-Hyp_4) **(*Figure 11B*)** (Nguema-Ona et al., 2014). L'ajout du galactose sur la sérine est catalysé par l'action de la sérine galactosyltransférase (SG1) dans le RE ainsi que dans l'appareil de Golgi (Saito et al., 2014). La nécessité de galactosylation de la sérine comme étape préliminaire requise pour permettre

l'arabinosylation des EXTs n'a pas encore été confirmé. L'arabinosylation des EXTs commence par l'ajout d'un premier résidu arabinose sur une hydroxyproline formant un motif arabinose-*O*-Hyp. Deux autres arabinosyltransférases appelé XEG113 et RRA3 vont, ensuite, respectivement catalyser l'ajout en β(1,2) du deuxième et du troisième arabinose, ce qui permet la mise en place d'une chaîne β(1,2)-arabinane (Velasquez et al., 2011). Un quatrième arabinose est, par la suite, rajouté avec une liaison α(1,3) grâce à une enzyme appelée ExAD (Extensin arabinose deficient) (Velasquez et al., 2012). Bien que l'arabinosylation des EXTs soit un processus variable greffant le plus souvent entre 3 et 4 résidus arabinoses, certaines EXTs présentent également un profil glycannique de *O*-glycanne avec 5 arabinoses. La présence de ce cinquième arabinose laisse supposer l'action d'une autre arabinosyltransférase encore inconnue à ce jour (Velasquez et al., 2012).

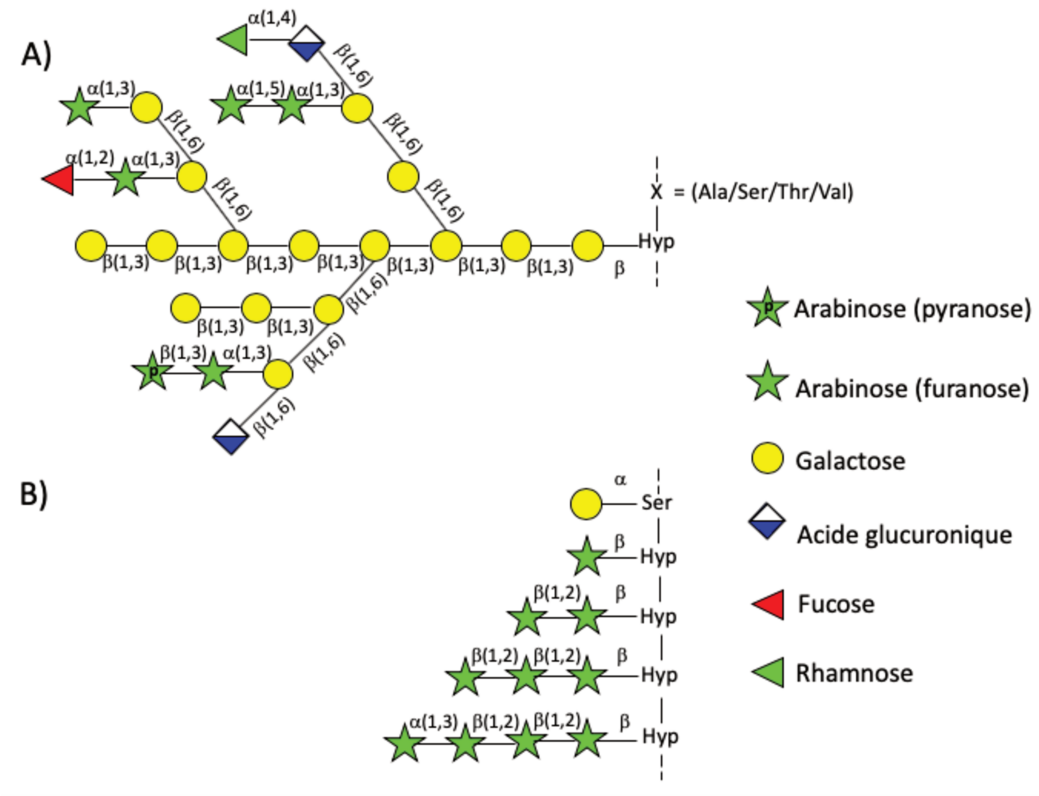


Figure 11 : Représentation des O-glycannes de type AGPs et EXTs présent chez les plantes d'après (Nguema-Ona et al., 2014).

A) Représentation schématique d'AGP présentant une chaîne principale composée de β(1,3)-galactoses sur une hydroxyproline (Hyp), après une alanine (Ala), serine (Ser), thréonine (Thr) ou valine (Val), ramifiée avec des chaînes de β(1,6)-galactoses elles même agrémentées de β(1,3)-galactoses, d'α(1,3)- et d'α(1,5)-arabinoses, d'acides glucuroniques et d'α(1,2)-fucoses sur les arabinoses. B) Représentation schématique d'une EXT sur un motif protéique composé d'une sérine (Ser) avec un galactose suivis de 4 hydroxyprolines (Hyp) avec des chaînes de β(1,2)-arabinoses.

V) Ingénierie des voies de *N*-glycosylation

Bien que tous les systèmes eucaryotes présentés précédemment aient montrés des succès de production de protéines recombinantes, les *N*-glycannes majoritairement retrouvés dans ces espèces sont différents des *N*-glycannes optimaux pour l'activité des protéines recombinantes en thérapie humaine. Ces différences peuvent s'avérer minimes, comme c'est le cas pour les cellules CHO, ou plus importantes, comme pour les cellules de levures et de plantes, où les glycosylations présentent des motifs *N*-glycanniques très différents : glycannes hypermannosylés ou présence de xyloses et fucoses immunogènes et absence de certains résidus comme les galactoses et les acides sialiques.

Ce sous-chapitre traitera des stratégies de mises en œuvre dans les systèmes de production des cellules de mammifères, levures et plantes, afin d'optimiser la production des glycoprotéines, portant des *N*-glycannes adéquats pour une utilisation en thérapie humaine.

A) Ingénierie de la glycosylation chez les cellules de mammifères

1) Retrait des épitopes immunogènes

Bien que la grande majorité des protéines recombinantes à intérêt thérapeutique soient aujourd'hui produites dans des cellules de mammifères, ces cellules ont eu besoin d'être améliorées pour pouvoir supporter la production de molécules utilisables en thérapie chez l'Homme. En effet, les glycoprotéines recombinantes exprimées dans des cellules de mammifères non humaines peuvent porter des glycannes potentiellement immunogènes pour l'Homme.

a) Retrait de l'épitope α(1,3)-galactose

L'épitope α(1,3)-galactose fait partie des motifs immunogènes les plus connus (van Beers and Bardor, 2012). Cet épitope est, par exemple, présent dans les cellules de souris qui possèdent des α(1,3)-galactosyltransférases, permettant le transfert d'un α(1,3)-galactose sur le galactose lié en β(1,4) du *N*-glycanne (Macher and Galili, 2008). Cet épitope est absent chez l'Homme et les primates (Galili et al., 1988; Chung et al., 2008). Plusieurs stratégies ont été utilisées afin d'éliminer la présence de cet épitope. Il a notamment été proposé de limiter l'α(1,3)-galactose en introduisant des glycosyltransférases utilisant le même substrat que l'α(1,3)-galactosyltransférase comme les sialyltransférases et l'α(1,2)-fucosyltransférase afin de générer une compétition inhibant l'addition d'α(1,3)-galactose (Cohney et al., 1997;

Sandrin et al., 1997). Ces travaux ont permis de limiter l'α(1,3)-galactose sans pour autant l'éliminer complétement. L'inactivation de l'α(1,3)-galactosyltransférase a également été effectuée chez la souris et le porc. Les résultats ont permis, par cette approche, de retirer la grande majorité des épitopes α(1,3)-galactose présents sur les *N*-glycannes de ces espèces (Tearle et al., 1996; Dai et al., 2002).

b) Retrait de l'épitope, acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc)

Un autre épitope synthétisé par les cellules de mammifères-non humaines, le Neu5Gc, a été bien documenté pour son immunogénicité chez l'Homme qui lui est capable de synthétiser l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) (Zhu and Hurst, 2002). Alors que l'Homme ne possède pas les voies de biosynthèse du Neu5Gc, il existe chez d'autres mammifères les voies de biosynthèse des deux acides sialiques, Neu5Gc et Neu5Ac (Padler-Karavani and Varki, 2011; Butler and Spearman, 2014). Il a ainsi pu être montré que l'érythropoïétine (EPO) produite de manière recombinante dans les cellules CHO possédait ces deux acides sialiques sur les glycannes en positions terminales (Hokke et al., 1990). Plusieures études de glyco-ingénierie ont été effectuées pour tenter de diminuer la présence de l'acide Neu5Gc sur les glycoprotéines de CHO. Il a été proposé, tout d'abord, de réduire le Neu5Gc en utilisant une stratégie d'ARN antisens (Chenu et al., 2003). Certaines études ont, également, proposé de changer les conditions de culture des cellules (Bardor et al., 2005; Borys et al., 2010). A titre d'exemple, l'ajout de butyrate de sodium dans le milieu de culture cellulaire des CHO a provoqué une diminution de synthèse du Neu5Gc de l'ordre de 50-62% (Borys et al., 2010). De la même manière, la substitution du carbonate de sodium par l'hydroxyde de sodium a permis de diminuer la synthèse du Neu5Gc jusqu'à 46% (Borys et al., 2010). Finalement, il a été conclu que la stratégie la plus efficace pour éliminer le Neu5Gc au sein des cultures CHO consistait à induire une compétition métabolique. En effet, la complémentation du milieu de culture avec du Neu5Ac humain a ainsi été mis en place et a permis de favoriser la présence de Neu5Ac sur les glycoprotéines (Bardor et al., 2005; Ghaderi et al., 2010).

2) Amélioration de la sialylation

En plus de l'absence du Neu5Gc, la sialylation humaine diffère également des autres mammifères par les liaisons de ces résidus Neu5Ac. Chez l'Homme, il existe deux sialyltransférases permettant la liaison du Neu5Ac au galactose, transférant soit en α(2,3), soit en α(2,6), avec une préférence pour le Neu5Ac lié en α(2,3). Contrairement à l'Homme, les

cellules CHO ne disposent que de l'α(2,3)-sialyltransférase et ne peuvent, ainsi, pas transférer les acides sialiques liés en α(2,6) sur les β(1,4)-galactoses. Plusieurs études d'ingénierie des *N*-glycannes se sont, donc, intéressées à l'amélioration de la sialylation des glycoprotéines de cellules de mammifères non-humaines. Il a ainsi pu être mis en évidence que la transfection de l'α(2,6)-sialyltransférase dans des cellules CHO a permis d'augmenter la proportion de Neu5Ac terminaux sur les β(1,4)-galactoses (Zhang et al., 1998).

3) Utilisation de mutants de glycosylation

L'utilisation de mutants de glycosylation s'est également avérée être une stratégie efficace pour la production de molécules thérapeutiques recombinantes, notamment avec l'existence des mutants de cellules CHO altérés dans leurs voies de *N*-glycosylation. Ces mutants peuvent être affectés à divers endroits de la synthèse des *N*-glycannes, comme dans le transport des nucléotides sucres ou au niveau des glycosyltransférases de l'appareil de Golgi.

a) Mutation de la GnT I

Parmi la grande quantité de mutants disponibles, certains ont plus spécifiquement attirés l'attention sur leurs éventuelles utilisations pour la production de protéines thérapeutiques. Par exemple, le mutant de cellule CHO Lec1 muté sur le gène codant pour la GnT I a été sélectionné comme un candidat intéressant. Ce mutant accumulant le motif $Man_5GlcNAc_2$ sur ses glycoprotéines, son utilisation a été envisagé pour produire la glucocérébrosidase, enzyme lysosomale permettant de traiter les patients atteints de la maladie de Gaucher, autrement dit, ayant une déficience pour cette enzyme (Esko and Stanley, 2009). La glucocérébrosidase produite dans ces mutants CHO Lec1 ne présente que des motifs glycanniques de type oligomannosidique, de ce fait, elle cible efficacement le récepteur du mannose présent sur les cellules réticuloendothéliales qui facilitent l'entrée de l'enzyme dans le lysosome (Zhou et al., 2013).

b) Mutants de fucosylation

Pour certaines molécules thérapeutiques, telles que les mAbs, l'activité biologique nécessite le recrutement par la voie du système immunitaire des anticorps dépendants de la cytotoxicité des cellules (ADCC) initiée par l'interaction du domaine Fc du mAb avec le FcγRIII, récepteur des macrophages. Or, cette interaction dépend beaucoup du *N*-glycanne présent

sur le domaine Fc. Il a été, en effet, démontré que l'absence totale du fucose sur le *N*-glycanne du fragment Fc augmente l'activité ADCC jusqu'à 100 fois (Yamane-Ohnuki et al., 2004). De plus, la mutation du gène FuT8 responsable de l'α(1,6)-fucosylation ainsi que la mutation du transporteur de GDP-fucose (SLC35C1) ont permis d'obtenir des cellules CHO présentant des profils glycanniques dépourvus de résidu fucose (Malphettes et al., 2010; Chan et al., 2016). Ces stratégies ont favorisé la production de mAbs avec des structures glycanniques dépourvues de fucose qui présentent une forte augmentation de l'activité ADCC avec un effet négligeable sur la durée de demi-vie des anticorps (Zhou et al., 2008).

B) Ingénierie de la *N*-glycosylation chez les levures

Comme expliqué précédemment, les levures possèdent des étapes de *N*-glycosylation semblables à celles de l'Homme sur les premières étapes de la voie de synthèse dans le RE, mais, les modifications golgiennes aboutissent à des *N*-glycannes matures très différents de ceux présents chez l'Homme. La modification génétique des voies de *N*-glycosylation a, donc, été nécessaire afin de pouvoir produire des biomédicaments utilisables en thérapie humaine dans ces organismes. Deux levures, *S. cerevisiae* et *P. pastori,* ont particulièrement été étudiées dans l'intention d'humanisation leurs voies de *N*-glycosylation.

1) Arrêt des voies d'hypermannosylation

a) Mutation des enzymes de l'hypermannosylation

La particularité des levures étant leur capacité à synthétiser des motifs glycanniques fortement mannosylés, les premières étapes d'humanisation des voies de *N*-glycosylation chez ces organismes se sont naturellement concentrées sur le blocage de ce processus afin d'accumuler un glycanne de type $Man_5GlcNAc_2$ dans l'appareil de Golgi (Pourcq et al., 2010).

Chez *S. cerevisiae et P. pastoris,* des mutants résultant de l'inactivation du gène Och1, qui est impliqué dans l'initiation des glycannes hyperglycosyl, ont été obtenus avec succès sans impacter la viabilité cellulaire mais pouvant, notamment dans le cas de *S. cerevisiae,* fortement diminuer la croissance cellulaire (Nagasu et al., 1992; Vervecken et al., 2004). Cette mutation a permis d'accumuler un glycanne de type $Man_8GlcNAc_2$ non homogène car modifié par des mannoses phosphates et α(1,3)-mannoses sous l'égide des enzymes, Mnn4 et Mnn1. L'inactivation des deux gènes codant pour ces enzymes a permis, ensuite, d'aboutir à un $Man_8GlcNAc_2$ homogène et majoritaire dans l'appareil de Golgi (Nakanishi-Shindo et al.,

1993). L'étape suivante s'est concentrée sur le retrait des α(1,2)-mannoses pour aboutir à la formation de $Man_5GlcNAc_2$. Pour cela, le gène codant pour l'α(1,2)-mannosidase d'*Aspergillus saitoi* a été exprimé chez *S. cerevisiae* et *P. pastoris* en fusion avec un tag HDEL afin de localiser l'action de l'α(1,2)-mannosidase dans le RE (Chiba et al., 1998; Callewaert et al., 2001). Les actions combinées de cette mannosidase avec les mutations de l'hypermannosylation (Och1, Mnn1, Mnn4) ont ainsi permis d'aboutir à la synthèse majoritaire du $Man_5GlcNAc_2$ (Choi et al., 2003).

b) Mutation sur le précurseur du RE

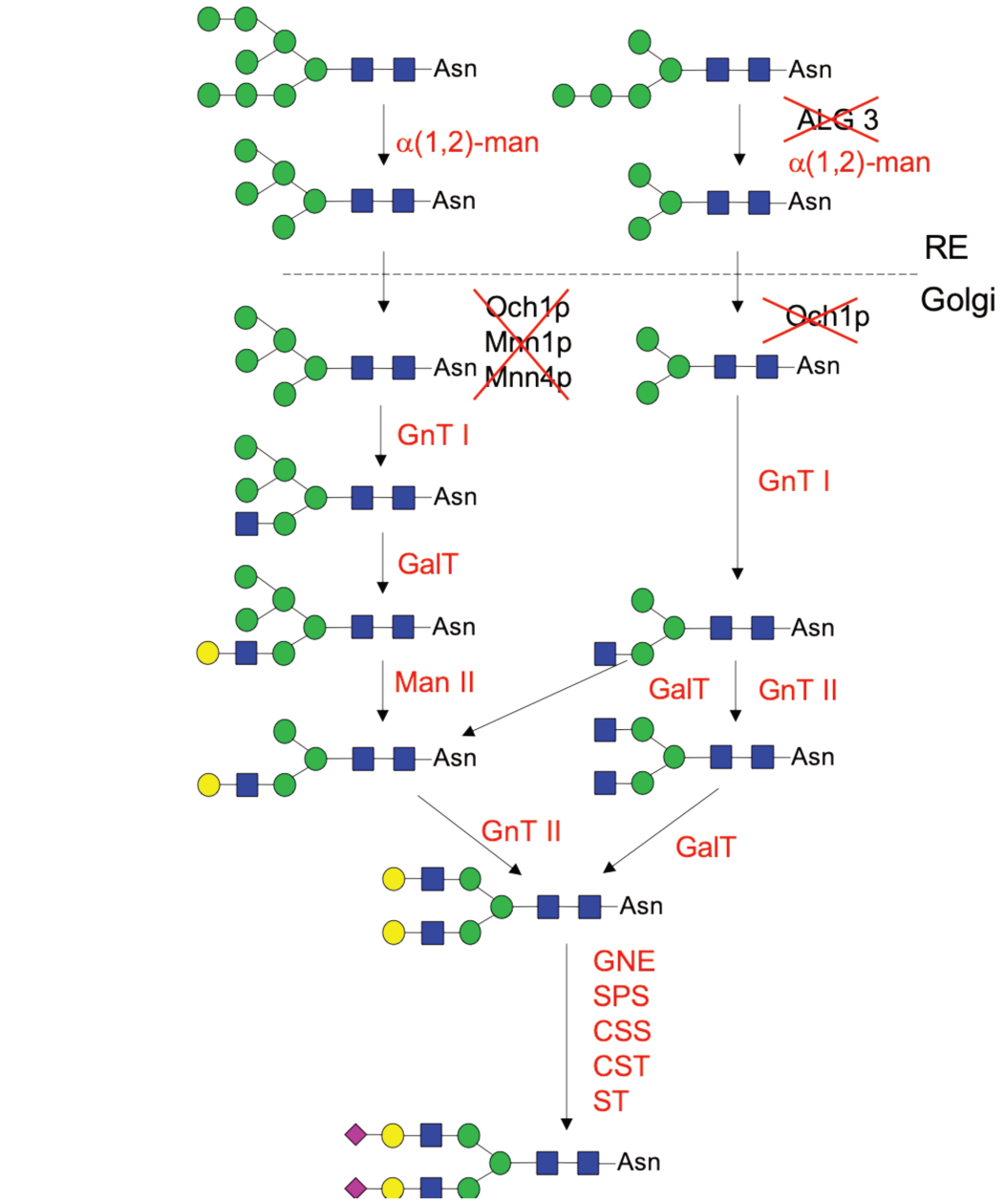
Une méthode alternative a également été proposée pour parvenir à un glycanne $Man_5GlcNAc_2$ majoritaire dans l'appareil de Golgi. Ainsi, la mutation du gène ALG3, codant pour la glycosyltransférase responsable de la formation de l'antenne « b » du précurseur, a montré chez *S. cerevisiae* une forte accumulation du $Man_5GlcNAc_2$ linéaire synthétisé dans le RE (Nakanishi-Shindo et al., 1993). *Chez P. pastoris*, cette mutation de l'ALG3 a donné un résultat plus efficace si elle était couplée avec la mutation de Och1 (Davidson et al., 2004). Le $Man_5GlcNAc_2$ ainsi accumulé peut, ensuite, être converti en $Man_3GlcNAc_2$ par l'introduction du gène codant l'α(1,2)-mannosidase d'*Aspergillus saitoi* avec le signal HDEL de rétention dans le RE **(*Figure 12*)**.

2) Ajout d'enzymes d'humanisation des glycannes

Afin d'avoir des glycannes similaires à ceux présents chez l'Homme, d'autres protéines comme des glucosidases, glycosyltransférases et transporteurs de nucléotides sucres ont été exprimées chez les levures. Le transporteur d'UDP-GlcNAc (*Kluyveromyces lactis* et *Mus musculus*) et la GnT I humaine ont, tout d'abord, été introduits chez *P. pastoris* permettant la formation de $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$ (Choi et al., 2003). La prochaine étape a consisté à retirer les α(1,3)- et α(1,6)-mannoses par ajout de la Man II de *Drosophila melanogaster*. Cette transformation a permis d'obtenir des glycannes majoritairement sous la forme $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$, confirmant ainsi que l'enzyme est active chez *P. pastoris*. Cependant, il a également été noté que le motif $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$ était reconnu par une α(1,2)-mannosyltransférase, chez la levure *P. pastoris,* permettant la formation de $GlcNAcMan_4GlcNAc_2$ et $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$ (Hamilton et al., 2003). L'introduction de la GnT II (*Ratus norvegicus*) chez *P. pastoris* a permis de palier à ce problème en générant une compétition entre la GnT II et l'α(1,2)-mannosyltransférase suffisamment tôt pour synthétiser majoritairement du $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ (Hamilton et al., 2003). La β(1,4)-galactosyltransférase humaine a, ensuite, été surexprimée avec succès chez *S. cerevisiae,* ce qui a conduit à la formation de *N*-glycannes portant des β(1,4)-galactoses

en position terminale (Hamilton et al., 2003). Dès lors, les levures disposent alors des capacités enzymatiques à former le motif $Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$, qui est le motif glycannique généralement retrouvé sur certaines glycoprotéines humaines **(*Figure 12*)**.

La dernière étape d'humanisation des voies de *N*-glycosylation chez les levures a consisté à rajouter des acides sialiques sur les galactoses terminaux du $Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$. Le problème est que le CMP-acide sialique est un sucre inexistant chez les levures. Ainsi, pour pouvoir sialyler les *N*-glycannes dans ces organismes, il va être primordiale d'introduire les gènes de biosynthèse des acides sialiques, ainsi que le transporteur de CMP-acide sialique et les sialyltransférases nécessaires pour l'étape finale de transfert de l'acide sialique sur le *N*-glycanne. Ceci a été réalisée chez *P. pastori* (Hamilton et al., 2006). Au cours de cette expérience, cinq gènes codant respectivement pour la UDP-*N*-acétylglucosamine-2-epimerase/*N*-acétylmannosamine kinase (GNE), la *N*-acétylneuraminate-9-phosphate synthase (SPS), la CMP-acide sialique synthase (CSS), le CMP-acide sialique transporteur (CST), et des sialyltransférases (ST), ont été ajoutés à une souche de *P. pastori* exprimant déjà des enzymes capables de parvenir à un glycanne de type $Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$. Les résultats ont montré que parmi les clones obtenus, certains étaient capables de synthétiser des glycoprotéines sialylées. La production de l'EPO dans ces clones a permis de mettre en évidence un profil glycannique avec plus de 90% d'acides sialiques en position terminale (Hamilton et al., 2006).



■ : *N*-acétylglucosamine, ● : Mannose, ● : Galactose, ◆ : Neu5Ac

Figure 12 : Résumé des étapes d'humanisation des voies de N-glycosylation chez la levure d'après (Pourcq et al., 2010).

ALG : Asparagine linked glycosylation, α(1,2)-mannosidase : α(1,2)-man, N-acétylglucosaminyltransférase I et II : GnT I et II, mannosidase II : Man II, galactosyltransférase : GalT, α(1,6)-mannosyltransférase : Och1p, mannosylphosphates-transférases : Mnn4p, α(1,3)-mannosyltransférase : Mnn1p, GNE : UDP-N-acétylglucosamine-2-epimerase/N-acétylmannosamine kinase, SPS : N-acétylneuraminate-9-phosphate synthase, CSS : CMP-acide sialique synthase, CST: CMP-acide sialique transporteur, ST : sialyltransférases.

C) Ingénierie de la *N*-glycosylation chez les plantes

1) Retrait des épitopes de plantes (xylose et fucose)

Afin de pouvoir utiliser les plantes comme système alternatif de production de protéines recombinantes, certaines modifications ont dû être effectuées au niveau de leurs voies de *N*-glycosylation. En effet, chez les plantes, comme *A. thaliana,* les glycannes transférés sur les glycoprotéines de plantes possédent naturellement des *N*-glycannes différent de ceux présents sur les glycoprotéines humaines avec la présence de résidus β(1,2)-xylose et α(1,3)-fucose. De plus, il a été montré que la présence de ces résidus β(1,2)-xylose et α(1,3)-fucose sur les glycannes de protéines végétales pouvait conduire à des réactions immunitaires lorsqu'ils sont introduits chez le rat, la chèvre ou encore le lapin avec pour conséquence la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre ces deux épitopes (Kurosaka et al., 1991; Faye et al., 1993; Bardor et al., 2003). Il a été également montré qu'une telle réaction immunitaire pouvait exister chez l'Homme. En effet, parmi 53 sera humains, environ 50% possèdent des anticorps dirigés, spécifiquement, contre le β(1,2)-xylose et 25% contre l'α(1,3)-fucose (Bardor et al., 2003). Cependant, la contribution de ces épitopes dans les réactions immunitaires humaines est encore débattue (Altmann, 2007; Manduzio et al., 2012).

Dans ce contexte, les recherches se sont, donc, intéressées au retrait de ces deux groupements sur les *N*-glycannes de plantes.

a) Signal de rétention dans le RE

Une première méthode de retrait des épitopes immunogènes a consisté à empêcher leurs ajouts sur les glycoprotéines en bloquant le transport de la glycoprotéine vers l'appareil de Golgi. Pour cela, la protéine d'intérêt a été fusionnée à son extrémité *C*-terminale avec un peptide signal KDEL ou HDEL permettant la rétention de la molécule dans le RE (Gomord et al., 1997; Sriraman et al., 2004; Petruccelli et al., 2006). Les résultats obtenus ont pu ainsi prouver que cette méthode permettait de s'affranchir, en partie, de la présence des épitopes immunogènes puisque les *N*-glycannes obtenus par cette approche sont des structures oligomannosidiques portant majoritairement 7 ou 8 mannoses. Cependant, cette méthode demeure une approche incomplète puisqu'il a été montré qu'environ 10% des glycoprotéines présentaient toujours les épitopes immunogènes (Ko et al., 2003; Gomord et al., 2005).

La production spécifique de *N*-glycannes oligomannosidiques peut avoir un intérêt dans certaines protéines à intérêt thérapeutique comme la glucocérébrosidase, dont les *N*-glycannes oligomannosidiques sont nécessaires pour que la protéine soit reconnue par les récepteurs des macrophages (Shaaltiel et al., 2007). Cependant, elle demeure limitée pour les protéines utilisées en thérapie injectable comme les mAbs.

b) Utilisation de mutants de glycosylation

La deuxième méthode élaborée pour se débarrasser des épitopes immunogènes de plantes a consisté à utiliser des mutants déficients pour des glycosyltransférases opérant dans la maturation du *N*-glycanne au sein de l'appareil de Golgi. Il a, notamment, été montré chez *A. thaliana* et le tabac *Nicotiana tabacum* que les α(1,3)-fucoses et le β(1,2)-xylose pouvaient être éliminés en effectuant un knock-out des α(1,3)-fucosyltransférases et de la β(1,2)-xylosyltransférase (Alonso et al., 2003; Strasser et al., 2004; Sourrouille et al., 2008). Les résultats de ces études ont permis de générer, pour la première fois, des protéines de plantes et des mAbs avec des *N*-glycannes dépourvus des épitopes immunogènes (Cox et al., 2006; Schähs et al., 2007; Schuster et al., 2007; Strasser et al., 2008).

Parallèlement, une glucocérébrosidase arborant des glycannes oligomannosidiques a été produite avec succès dans des graines mutantes d'*A. thaliana*appelée cgl et ayant la particularité d'être déficiente pour la GnT I qui effectue le transfert du GlcNAc sur le $Man_5GlcNAc_2$ dans l'appareil de Golgi (He et al., 2012). L'absence de l'activité GnT I a permis de produire de la glucocérébrosidase avec plus de 97% de $Man_5GlcNAc_2$ et très peu de *N*-glycannes immunogènes $Man_3XylGlcNAc_2$, $Man_3FucGlcNAc_2$ ou $Man_3XylFucGlcNAc_2$.

c) Inactivation des xylosyltransférases et fucosyltransférases par siRNA

Une autre méthode utilisée pour retirer les résidus xyloses et fucoses immunogènes des *N*-glycannes de plantes a consisté à utiliser l'interférence par ARN. Cette technique, utilisant l'introduction d'ARN simple ou double brin dont l'interférence avec un ARN messager conduit à la dégradation de ce dernier, a été utilisée chez les plantes afin de réduire les épitopes immunogènes. Il a ainsi été montré chez *Nicotiana benthamiana* que l'inactivation des xylosyltransférases et fucosyltransférases permettaient de réduire considérablement les *N*-glycannes immunogènes de plantes sans pour autant les retirer complètement (Strasser et al., 2008).

d) Retrait des fucoses et xyloses par édition génétique

Plus récemment, les technologies d'édition génétique comme TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*) ou encore CRISPR-Cas9 ont été utilisées pour retirer les enzymes responsables de l'ajout du α(1,3)-fucose et du β(1,2)-xylose. Des études ont, d'abord, permis de retirer chez *N. benthamiana* par TALEN un grand nombre de fucoses et xyloses immunogènes par inactivation des deux xylosyltransférases et deux des cinq fucosyltransférases responsables de leurs transferts (Li et al., 2016). Une approche par CRISPR-cas9 a été effectuée chez les cellules BY-2 de *N. tabacum,* ou les deux xylosyltransférases et quatre fucosyltransférases ont permis de réduire la part des *N*-glycannes immunogènes (Mercx et al., 2017). Plus récemment, l'inactivation par CRISPR-Cas9 des deux xylosyltransférases et des cinq fucosyltransférases de *N. benthamiana* a permis d'obtenir des *N*-glycannes dépourvus de ces deux épitopes (Jansing et al., 2018). La production d'anticorps dans ces plantes, dépourvues de xylose et de fucose, a ainsi montré que la liaison au Fc gamma récepteurs était bien supérieure à celle du même anticorps produit dans une plante sauvage et comparable à l'affinité de liaison de l'anticorps standard produit dans CHO (Jansing et al., 2018).

2) Ajout d'enzymes d'humanisation chez les plantes

a) Galactosylation des glycannes de plantes

Comme les plantes ne possèdent pas naturellement de β(1,4)-galactosyltransférase, il leur est impossible d'ajouter les résidus β(1,4)-galactoses conduisant au motif $Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ nécessaire à l'étape ultérieure de sialylation chez les mammifères. Les premiers travaux d'humanisation des voies de *N*-glycosylation ont cherché à exprimer la β(1,4)-galactosyltransférase humaine chez les cellules BY-2 et dans des plantes de tabac (Palacpac et al., 1999; Bakker et al., 2001). Les résultats ont permis de montrer que l'ajout de la β(1,4)-galactosyltransférase humaine permettait de générer des glycannes galactosylés en β(1,4), ainsi qu'une diminution des espèces fucosylées et xylosylées. La production d'anticorps dans des plants de tabac exprimant la β(1,4)-galactosyltransférase humaine a permis d'aboutir à la production d'un anticorps avec environ 30% de glycannes galactosylés (Bakker et al., 2001). Il a également été démontré que l'expression précoce de la GalT était un outil puissant pour se débarrasser des épitopes xylose et fucose, dont les glycosyltransférases respectives ne peuvent pas agir si le motif glycannique possède déjà des galactoses terminaux (Bakker et

al., 2006). La construction d'une enzyme hybride avec la partie *N*-terminale de la β(1,2)-xylosyltransférase et la partie catalytique de la β(1,4)-galactosyltransférase a permis d'obtenir des glycannes fortement galactosylés sans xylose et avec une très faible proportion de glycannes fucosylés (Bakker et al., 2006; Vézina et al., 2009). L'expression de la GalT hybride dans des cellules mutantes XylT/FucT construite avec la partie *N*-terminale de l'α(2,6)-sialyltransférase de rat, permettant une localisation dans la partie trans de l'appareil de Golgi, a donné de meilleurs résultats. Avec cette méthode, un anticorps dirigé contre le VIH a pu être produit avec une majorité des glycannes présentant la glycoforme $Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ (Strasser et al., 2009).

b) Formation de glycannes tri- et tetra-antennés

Les glycannes tri- à tetra-antennés étant les glycoformes majoritairement présentes sur l'EPO chez les mammifères, l'expression des *N*-acétylglucosaminyltransférases humaines GnT III, GnT IV et GnT V est nécessaire pour parfaire l'humanisation de la *N*-glycosylation des plantes. La GnT III a, d'abord, été exprimée avec succès dans le tabac. Il a ainsi été montré que la GnT III était capable de rajouter la GlcNAc bissectrice sur les *N*-glycannes de plantes (Rouwendal et al., 2007). L'expression de la GnT III, GnT IV, GnT V et FuT8 a été effectuée, par la suite, dans des graines de *N. benthamiana* déficientes en épitopes immunogènes de plantes (α(1,3)-fucoses et β(1,2)-xyloses) (Castilho et al., 2011)**(*Figure 13*)**. Cette approche a permis de produire dans une plante de l'EPO arborant des glycannes majoritairement tri- et tetra-antennés possédant une GlcNAc bissectrice.

c) Sialylation des glycannes de plantes

Plus récemment, des études d'ingénieries ont été effectuées pour parvenir à produire des glycannes possédant des acides sialiques en position terminale chez les plantes. Contrairement aux mammifères, les plantes ne possèdent pas d'acides sialiques et sont, donc, incapables de sialyler leurs *N*-glycannes (Séveno et al., 2004; Zeleny et al., 2006). Or, il a déjà été montré dans les cellules de plantes BY-2 que la production d'EPO sans *N*-glycannes sialylés conduisait à une dégradation très rapide de la glycoprotéine recombinante (Matsumoto et al., 1995). Pour pouvoir générer des *N*-glycannes de plantes avec des acides sialiques, il faut, dans un premier temps, introduire tous les gènes de la voie de biosynthèse du CMP-acide sialique dans le cytoplasme. Dans un deuxième temps, il faut introduire le transporteur du CMP-acide sialique qui permet l'entrée de ce dernier dans l'appareil de Golgi. Enfin, dans un troisième

temps, il est nécessaire d'exprimer les deux sialyltransférases qui permettent l'ajout des acides sialiques en α(2,3) et α(2,6) sur les galactoses terminaux du glycanne $Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$.

Des travaux précurseurs ont d'abord cherché à exprimer la CMP-Neu5Ac synthase et le transporteur de CMP-acide sialique dans les cellules de tabac BY-2. L'étude a notamment montré par une approche *in-vitro* que les plantes étaient ainsi capables de transporter du Neu5Ac (Misaki et al., 2006). Les recherches se sont, ensuite, intéressées à la synthèse du Neu5Ac chez le tabac à partir du ManNAc et du pyruvate (Paccalet et al., 2007). Les résultats ont montré que l'expression de la Neu5Ac synthase permettait de convertir le ManNAc et le pyruvate en Neu5Ac et que cette réaction était réversible avec l'expression de la Neu5Ac lyase. Castilho et collaborateurs en 2010, ont finalement réussi à exprimer chez le tabac des glycannes avec des acides sialiques (Castilho et al., 2010). Ces travaux reposant sur l'expression dans des plantes mutantes XylT/FucT des différentes enzymes de biosynthèse, de transport et de transfert de l'acide sialique ont ainsi permis d'établir une voie de sialylation chez *N. benthamiana* (Kallolimath et al., 2016).

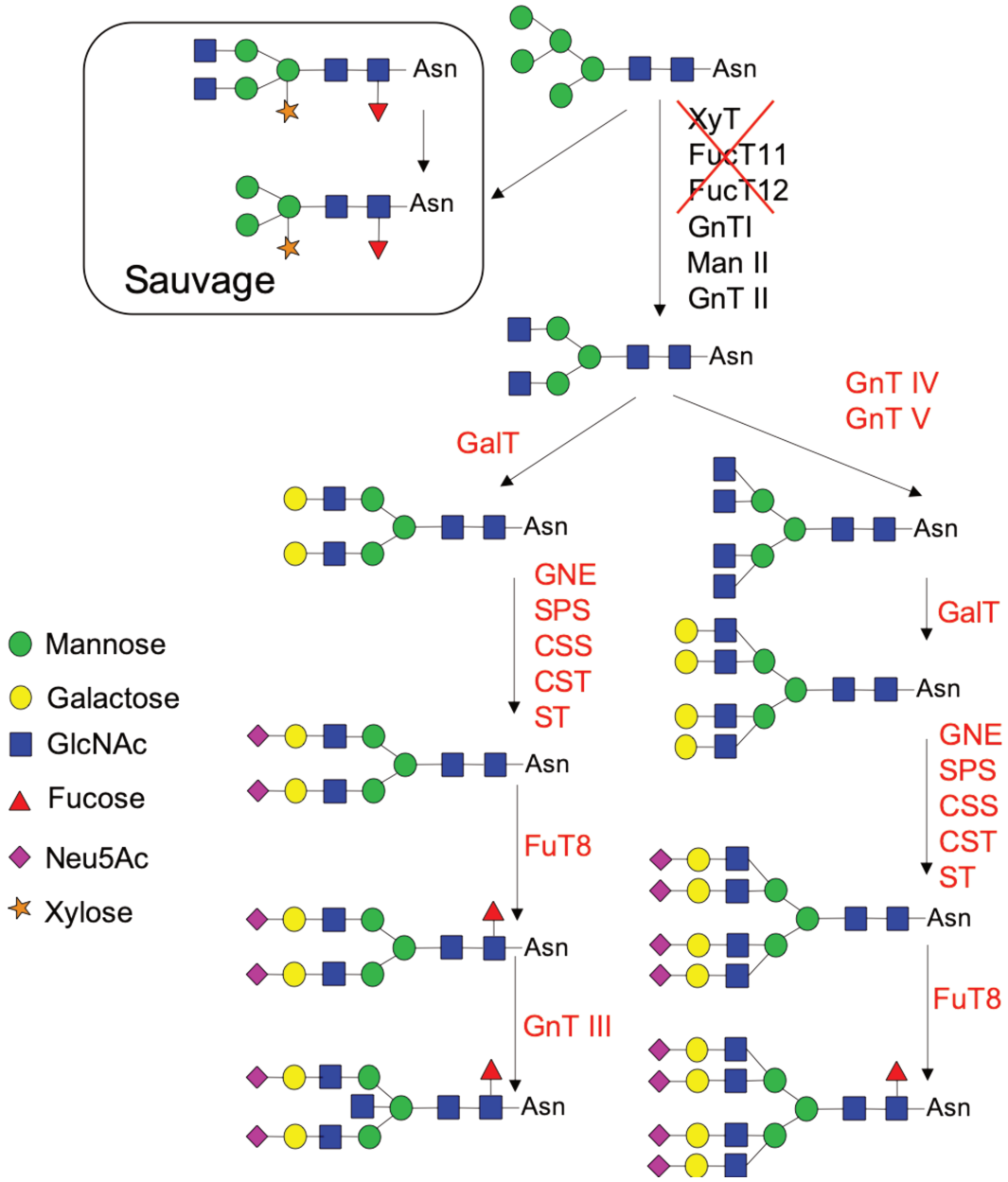


Figure 13 : Humanisation de la voie de N-glycosylation chez les plantes, modifié d'après (Chen, 2016)

Schéma représentant les différents épitopes retrouvés sur les structures glycanniques obtenues par ingénierie de la N-glycosylation en comparaison avec les N-glycannes de plantes sauvages. Asn : asparagine, Man II : mannosidase II, GnT I à V : N-acétylglucosaminyltransférase I à V, XylT : β(1,2)-xylosyltransférase, FucT11/12 : α(1,3)-fucosyltransférase, FuT8 : α(1,6)-fucosyltransférase, GalT : β(1,4)-galactosyltransférase, GNE : UDP-N-acétylglucosamine-2-epimerase/N-acétylmannosamine kinase, SPS : N-acétylneuraminate-9-phosphate synthase, CSS : CMP-acide sialique synthase, CST : CMP-acide sialique transporteur, ST : sialyltransférases

VI) Les microalgues : nouvelles alternatives pour la production de protéines recombinantes

A) Généralités sur les microalgues

Les microalgues sont des micro-organismes (taille de l'ordre du micron) aquatiques photosynthétiques diversifiés comprenant aussi bien des organismes eucaryotes que des procaryotes. La classification des microalgues repose principalement sur des différences de pigments, natures des réserves et structures cellulaires présentes dans ces organismes. Pour les microalgues procaryotes ou cyanobactéries comme la spiruline, l'inclusion de ces organismes dans les microalgues fait encore débat dans la communauté scientifique compte-tenu du fait que ce sont des organismes procaryotes alors que toutes les autres microalgues appartiennent aux eucaryotes. Les microalgues eucaryotes se divisent en trois grandes familles : les microalgues vertes, les microalgues brunes et les microalgues rouges dont les espèces sont reparties dans les groupes suivants : Bacillariophytes, Charophytes, Chlorophytes, Chrysophytes, Cryptophytes, Dinophytes, Euglenophytes, Glaucophytes, Haptophytes, Phaeophytes et Rhodophytes (Keeling, 2013) **(*Figure 14*)**.

L'intérêt pour les microalgues dans le secteur des biotechnologies et surtout lié aux avantages uniques apportés par ces organismes. Parmi ces avantages, nous pouvons citer la capacité à croitre rapidement ainsi que le faible coût associé au milieu de culture et la non compétition avec les surfaces agricoles dédiées à l'alimentation humaine (Brennan and Owende, 2010). Qui plus est, en tant qu'organismes photosynthétiques, les microalgues sont d'excellents modèles d'usine cellulaire permettant la conversion de l'énergie lumineuse solaire en biomasse par la production d'hydrogène, d'acides gras, de lipides, de carbohydrates, de polysaccharides, de protéines, de composés phénoliques, pigments, et d'antioxydants (Sommer et al., 1992; Elalla and Shalaby, 2009; Kruse and Hankamer, 2010).

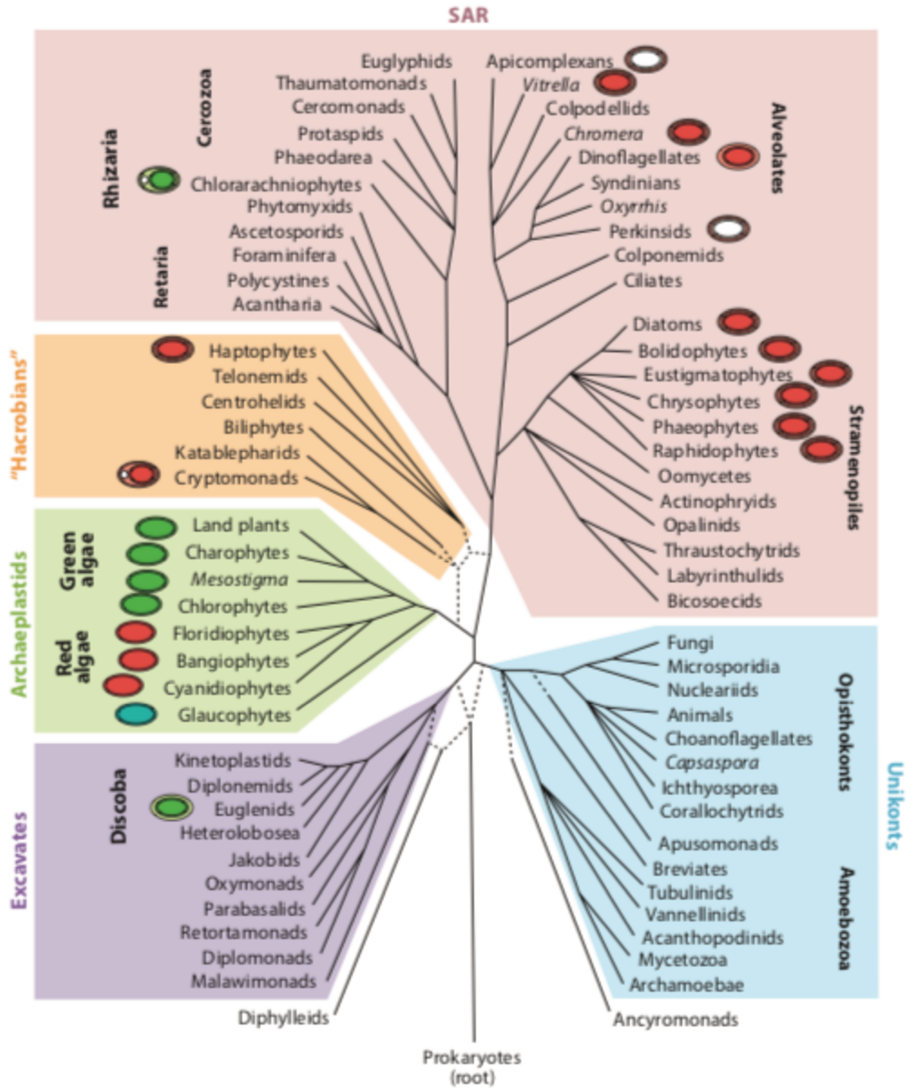


Figure 14 : Arbre phylogénétique des microalgues d'après (Keeling, 2013)

Au niveau de cette synthèse bibliographique, les microalgues *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornutum* seront principalement décrites car elles représentent les deux modèles étudiés au cours de ce travail de thèse. Ces espèces ont notamment été choisies pour leur éloignement phylogénétique au sein des microalgues, l'une étant une chlorophycée et l'autre une diatomée.

1) *Chlamydomonas reinhardtii*

C. reinhardtii est une microalgue verte d'eau douce unicellulaire de forme ovale d'environ 10 µm appartenant à la famille des chlorophycées. Sa structure cellulaire, délimitée par une paroi, comporte un unique chloroplaste occupant 40% de l'espace intracellulaire en forme de U autour du noyau. De nombreuses mitochondries sont également présentes pour la respiration cellulaire, ainsi qu'un appareil de Golgi, un pyrénoïde, un organe particulier

appelé stigma (eyespot) régulant l'action des deux flagelles permettant le déplacement dans le milieu et l'appariement cellule-cellule **(*Figure 15*)**.

Cette microalgue est également capable d'effectuer une croissance hétérotrophe (en absence de photosynthèse) en utilisant un substrat carboné, l'acétate, qui lui sert de source d'énergie et de carbone (Chen and Johns, 1996).

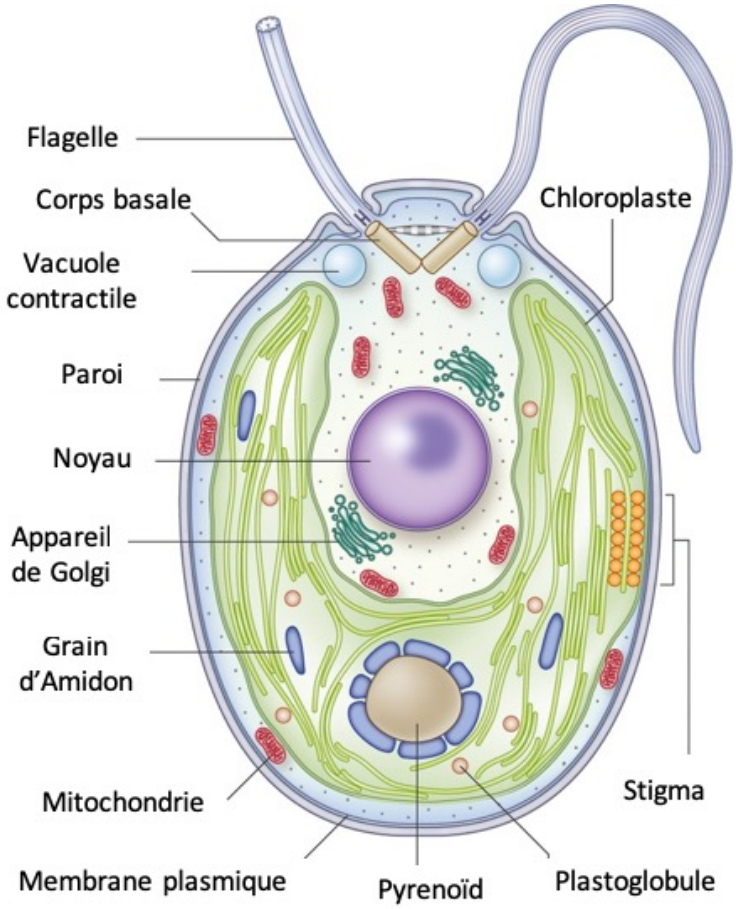


Figure 15 : Schéma détaillé de la structure cellulaire de C. reinhardtii d'après (Sasso et al., 2018)

La figure schématise la structure cellulaire de C. reinhardtii. La cellule délimitée par une paroi contient un noyau, un unique chloroplaste occupant la majorité de la cellule, ainsi que des mitochondries, un appareil de Golgi et des organes de réserve comme un pyrénoide et des grains d'amidon. La cellule possède également un organe appelé stigma, commandant par l'intensité lumineuse la mobilité de la cellule par ses flagelles.

C. reinhardtii est une microalgue modèle, elle est actuellement la microalgue verte la plus utilisée en laboratoire notamment dans des applications biotechnologiques (Scaife et al., 2015). De nombreuses raisons ont orienté ce choix. Tout d'abord, *C. reinhardtii* est une microalgue reconnue comme non dangereuse ou GRAS (*Generaly Recognized As Safe*) par la FDA, ce qui lui a permis d'être très largement utilisée par la communauté scientifique pour

l'étude de la photosynthèse (Rochaix, 2002), du mouvement des flagelles et du métabolisme d'accumulation des lipides (Marshall, 2008; Ball et al., 1990). Le génome de *C. reinhardtii* d'une taille approximative de 120 millions de paires de bases (62% de bases G/C en moyenne) et réparti sur 17 chromosomes a été entièrement séquencé, facilitant ainsi les travaux de biologie moléculaire (Merchant et al., 2007). De nombreux outils de biologie moléculaire, comme la transgénèse, sont également disponibles autant sur le génome nucléaire que sur le génome chloroplastique avec différentes techniques comme les billes de verre (Kindle, 1990) ou l'électroporation (Shimogawara et al., 1998).

C. reinhardtii est également une microalgue intéressante vis-à-vis de son cycle de vie. Si cette dernière est, la plupart du temps, haploïde avec une reproduction asexuée lui conférant un temps de génération court, de l'ordre de 8 h, elle est également capable en condition de stress (notamment en carence azotée) d'effectuer la reproduction sexuée entre deux cellules de polarité différentes (mt+ et mt-), ce qui s'avère un atout très utile pour la génération de doubles mutants ou doubles transformants (Goodenough et al., 2007).

De plus, *C. reinhardtii* est une microalgue pouvant être très facilement cultivée dans des fermenteurs munis d'éclairage (photobioréacteurs) où la culture d'organismes génétiquement modifiés (OGM) est entièrement contrôlée et permet d'éviter la dissémination des OGMs dans l'environnement (Takache et al., 2012).

2) *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum est une microalgue d'eau marine brune de la famille des diatomées et est, actuellement, la seule représentante du genre Phaeodactylum (Lewin et al., 1958). La structure cellulaire de cette microalgue est délimitée par une coque en silice particulière aux diatomées appelée frustule, composé de deux parties s'emboitant l'une dans l'autre (Zurzolo and Bowler, 2001). Cette microalgue possède également la particularité d'exister sous trois morphotypes différents : fusiforme, ovale et triradié (Martino et al., 2007). La reproduction de cette microalgue est principalement asexuée, ce qui permet d'avoir un temps de génération court et fournit ainsi une production rapide de biomasse.

Le génome de *P. tricornutum* a été entièrement séquencé en 2008 ce qui facilite les travaux de biologie moléculaire (Bowler et al., 2008). Différents outils de biologie moléculaire

ont récemment été développés non seulement pour transformer *P. tricornutum* (électroporation, biolistique et conjugaison) mais également pour éditer son génome (TALEN et CRISPR-Cas9) (Daboussi et al., 2014; Zhang and Hu, 2014; Karas et al., 2015; Nymark et al., 2016; Serif et al., 2017; Stukenberg et al., 2018).

B) Production de molécules à intérêt thérapeutiques chez les microalgues

C. reinhardtii et *P. tricornutum* ont récemment été évaluées quant à leur aptitude à exprimer des protéines recombinantes à visée thérapeutique.

1) Chlamydomonas reinhardtii

La grande majorité des essais d'expression de protéines recombinantes a été effectuée chez la microalgue modèle *C. reinhardtii*. Ce choix résulte en partie du fait que *C. reinhardtii* est actuellement la microalgue la plus utilisée pour des applications biotechnologiques.

La grande majorité des protéines recombinantes produites dans cette microalgue ont été réalisées par transformation du génome chloroplastique. Des expressions ont également été effectuées par transformation du génome nucléaire. Cette stratégie est à privilégier pour produire des protéines recombinantes nécessitant des modifications post-traductionnelles comme la *N*- et la *O*-glycosylation. La production de certaines de ces protéines recombinantes est résumée dans la **Tableau 3**.

Tableau 3 : Protéines recombinantes produites dans la microalgue C. reinhardtii

Protéine Recombinante	**Fonction**	**Génome**	**Référence**
Anti-glycoprotéine D de HSV-1	Anticorps contre le virus de l'herpès	Chloroplaste	(Mayfield et al., 2003)
Anti-PA 83 anthrax IgG1	Anticorps contre l'anthrax	Chloroplaste	(Tran et al., 2009)
Métallothionéine-2	Anti-radiation	Chloroplaste	(Zhang et al., 2006)
TRAIL	Anti-cancer	Chloroplaste	(Yang et al., 2006)
Allophycocyanine	Anti-cancer	Chloroplaste	(Su et al., 2005)
VEGF	Stimule la vasculogenèse et l'angiogenèse	Chloroplaste	(Rasala et al., 2010)
HMGB1	Anti-inflammatoire	Chloroplaste	Rasala et al. (2010)
Érythropoïétine	Traitement contre l'anémie	Nucléaire	Eichler-Stahlberg et al. (2009)
VP1-CTB	Protection contre FMDV	Chloroplaste	(Sun et al., 2003)
E2	Protection contre CSFV	Chloroplaste	(He et al., 2007)
V28	Vaccin contre le syndrome des taches blanches	Chloroplaste	(Surzycki et al., 2009)
GAD65	Traitement du diabète de type 1	Chloroplaste	(Wang et al., 2008)
D2-CTB	Protection contre *S. aureus*	Chloroplaste	(Dreesen et al., 2010)
E7 HPV-16	Vaccin contre papillomavirus HPV-16	Chloroplaste	(Demurtas et al., 2013)
GBSS-AMA1	Vaccin contre malaria	Nucléaire	(Dauvillée et al., 2010)
GBSS-MSP1	Vaccin contre malaria	Nucléaire	(Dauvillée et al., 2010)

Cependant, les protéines recombinantes actuellement produites dans *C. reinhardtii* sont secrétés dans des quantités très faibles comparé aux cellules CHO (Demain and Vaishnav, 2009; Eichler-Stahlberg et al., 2009). Cette faible capacité de sécrétion protéique a, notamment, poussé la communauté scientifique à chercher d'autres microalgues pour la production de protéines recombinante, comme *P. tricornutum*, ainsi qu'à optimiser la sécrétion des protéines recombinantes. Par exemple, il a, récemment, été montré que la sécrétion de protéines recombinantes pouvait être multipliée par 15 chez *C. reinhardtii* en

rajoutant au niveau de l'extrémité *C*-terminale de la protéine des unités répétées en tandem de résidus sérine-proline de 10 à 20 répétitions (Ramos-Martinez et al., 2017).

2) *Phaeodactylum tricornutum*

La diatomée *P. tricornutum* a récemment intéressé la communauté scientifique pour la production de protéines recombinantes. A l'heure actuelle, deux anticorps ont été produits dans cet organisme : un anticorps dirigé contre le virus de l'hépatite B et un anticorps dirigé contre le virus de Marburg **(*Tableau 4*)** (Hempel et al., 2011; Hempel and Maier, 2012; Hempel et al., 2017). La qualité et la fonctionnalité de l'anticorps dirigé contre le virus de l'hépatite B a récemment été montré, notamment sa capacité à se lié aux Fcγ récepteurs (FcγR) (Vanier et al., 2015, 2018). Les résultats ont également montré que l'affinité de l'anticorps chez *P. tricornutum* était 4,5 fois moindre que le même type d'anticorps produit chez l'Homme pour FcγRI, et trois fois plus importante pour FcγRIIIa.

Tableau 4 : Protéines recombinantes produites dans la diatomée P. tricornutum

Protéines recombinantes	**Fonction**	**Génome**	**Reference**
Anti-HBsAg	Anti Hépatite B	Nucléaire	(Hempel et al 2011)
Alpha MARV NP IgG	Anti-virus de Marburg	Nucléaire	(Hempel et al 2017)

C) Glycosylation des microalgues

Chez les microalgues, peu d'études se sont, pour le moment, portées sur la compréhension des processus de *N*-glycosylation des protéines. A l'heure actuelle, seul six espèces de microalgues, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyrydium sp, Botryococcus braunii, Euglena gracilis et Chlorella vulgaris* ont retenu l'attention des chercheurs en ce qui concerne l'étude des *N*-glycannes présents sur les glycoprotéines endogènes (Baïet et al., 2011; Levy-Ontman et al., 2014; Mathieu-Rivet et al., 2013; Mócsai et al., 2019; O'Neill et al., 2017; Schulze et al., 2017). Nous détaillerons ici principalement les modèles *C. reinhardtii* et *P. tricornutum*, étant les deux espèces étudiées dans le cadre de ces travaux de thèse et citerons uniquement les structures glycanniques majoritaires des autres microalgues.

1) Formation du précurseur glycannique dans le RE

La synthèse du précurseur glycannique étant encore considérée par la plupart des glycobiologistes comme une étape très conservée parmi les organismes eucaryotes. Aucune étude biochimique n'a pour le moment été réalisée chez les microalgues dans le but d'identifier les précurseurs glycanniques synthétisés dans ces organismes. Pour l'heure, seule la comparaison des séquences protéiques et génomiques des enzymes actrices de la synthèse du précurseur glycannique d'*A. thaliana* ont été effectuées sur les données bio-informatiques de *C. reinhardtii* et *P. tricornutum* (Baïet et al., 2011; Mathieu-Rivet et al., 2013; Mathieu-Rivet et al., 2014).

a) C. reinhardtii

L'étude des données génomiques effectuée (Levy-Ontman et al., 2014; Mathieu-Rivet et al., 2014; 2013) montre que la grande majorité des enzymes impliquées dans la synthèse du précurseur présente des candidats par homologie des séquences avec *A. thaliana*. Cependant, l'étude montre également que certaines enzymes (ALG3, ALG9, ALG10 et ALG12) n'ont pas clairement été identifiées. Or, ALG3, ALG9, ALG10, responsables de la formation des antennes « b » et « c », et ALG12 responsable de l'ajout du dernier glucose sur le précurseur, sont essentielles pour la production du précurseur $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol. Ces résultats génomiques interrogent sur la réelle structure du précurseur oligosaccharide lié au dolichol produit dans le RE de *C. reinhardtii*.

b) P. tricornutum

Comme pour *C. reinhardtii*, la formation du précurseur chez *P. tricornutum* a été étudiée uniquement par des analyses bioinformatiques (Baïet et al., 2011; Levy-Ontman et al., 2014). La comparaison des séquences a mis en avant des homologies avec tous les acteurs de la synthèse des précurseurs glycanniques hormis les séquences correspondant à l'ALG12 et la GS I, ces enzymes étant respectivement responsables de l'ajout du dernier glucose sur le précurseur et son retrait dans le contrôle qualité. Ces informations laissent supposer qu'une différence du précurseur serait également possible dans cette microalgue, qui en tenant compte des prévisions issues des analyses bioinformatiques, synthétiserait un précurseur $Glc_2Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol.

2) Formation des *N*-glycannes complexes dans l'appareil de Golgi.

a) C. reinhardtii

Une étude effectuée par Mattieu-Rivet et collaborateurs à chercher à caractériser les voies de *N*-glycosylation chez la microalgue verte *C. reinhardtii* par une analyse bioinformatique combinée à une analyse biochimique des *N*-glycannes (Mathieu-Rivet et al., 2013). L'étude a, notamment, permis d'identifier les structures des *N*-glycannes présents sur les glycoprotéines de cette espèce. La forme majoritaire présente chez cette microalgue est un motif $Man_5GlcNAc_2$-Asn après l'intervention de la mannosidase I (Man I). Les données bioinformatiques ne donnent aucune séquence homologue à la GnT I responsable de la synthèse du $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$-Asn. De même, comme aucun motif glycannique $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$-Asn n'a été observé dans les analyses biochimiques, il semblerait, donc, que cette microalgue suive une voie de maturation des *N*-glycannes indépendante de la GnT I (Mathieu-Rivet et al., 2014)**(*Figure 16*)**.

L'étude a également mis en évidence la présence de groupement xylose greffé en β(1,2) sur le corps glycannique à l'instar de ce qui avait déjà été identifié chez les plantes (Lerouge et al., 1998). Un second résidu xylose, dont la position sur le *N*-glycanne n'a pas encore clairement été identifiée, ainsi que des groupements méthyles sur les mannoses ont également été mis en évidence, ces modifications retrouvées chez cette microalgue ne sont pas encore bien comprises, mais reflètent bien la différence de machinerie enzymatique de cette microalgue vis-à-vis des autres eucaryotes. Une fucosyltransférase (FucT) est également prédite par homologie de séquence avec la fucosyltransférase (FucT11-12) d'*A. thaliana*, cependant, aucun glycanne fucosylé n'a été clairement identifié pour l'instant par une approche glycomique (Mathieu-Rivet et al., 2013).

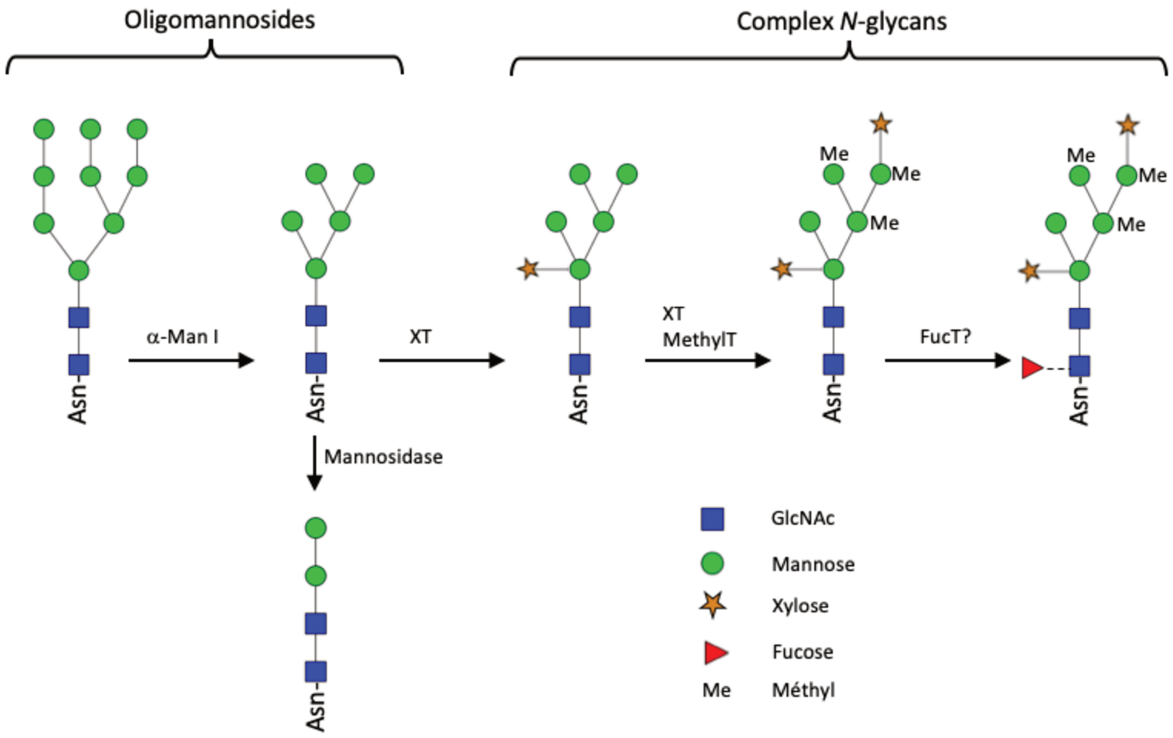


Figure 16 : Maturation des N-glycannes chez la microalgue C. reinhardtii d'après Mathieu-Rivet et al., 2013 ; 2014

Schéma résumant la synthèse du N-glycanne de C. reinhardtii dans l'appareil de Golgi à partir du $Man_9GlcNAc_2$. Après la réduction en Man5GlcNAc2 par l'α-mannosidase I (α-Man I) peuvent agir des xylosyltransférases (XT), une fucosyltransférase (FucT) et des méthyltransférases (MethylT), pouvant ajouter jusqu'à trois groupements méthyles sur le N-glycanne mature.

b) *P. tricornutum*

L'analyse de la *N*-glycosylation des protéines a également été investie chez la microalgue *P. tricornutum* par une étude biochimique des *N*-glycannes (Baïet et al., 2011). Cette diatomée présente un profil glycannique différent de celui retrouvé chez *C. reinhardtii*. Tout d'abord, les *N*-glycannes produits par *P. tricornutum* n'ont ni résidu xylose ni groupement méthyle. De plus, la présence de glycannes paucimannosidiques semble montrer que cette microalgue, contrairement à *C. reinhardtii*, possèderait une activité GnT I et mannosidase II comme la plupart des organismes eucaryotes (Mathieu-Rivet et al., 2014). La présence du glycanne $Man_3GlcNAc_2$ laisse également supposer que le GlcNAc terminal serait éliminé selon un processus encore inconnu. Il a été proposé qu'une action hexosaminidase (HexNAcase) enlèverait le GlcNAc terminal du $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$. Deux séquences codant pour des hexosaminidases putatives ont été identifiées dans le génome de *P. tricornutum* (Baiet et al., 2011) **(*Figure 17*)**.

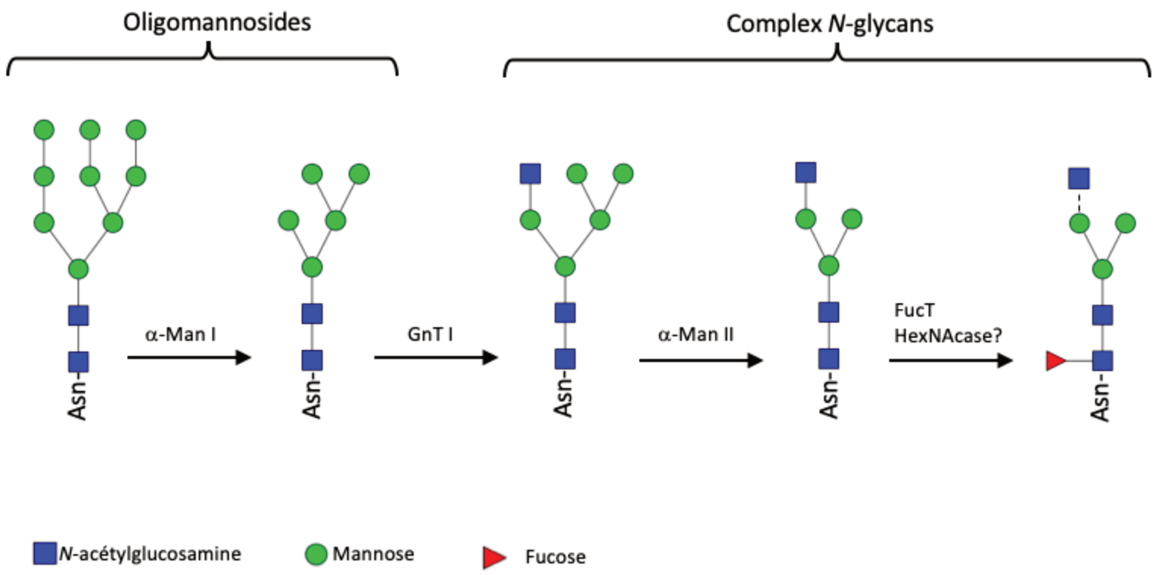


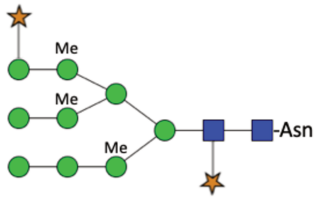
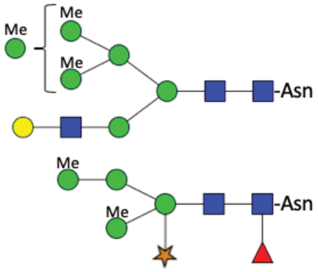
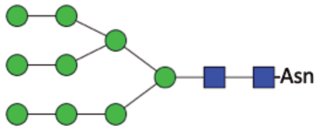
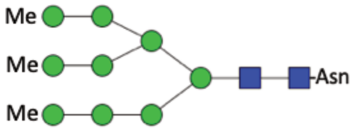
Figure 17 : Hypothèse du processus de maturation des N-glycannes chez la microalgue P. tricornutum

Schéma résumant la synthèse du N-glycanne de P. tricornutum dans l'appareil de Golgi à partir du $Man_9GlcNAc_2$. α-mannosidase I: α-Man I, N-acétylglucosaminyltransférase I: GnT I, α-mannosidase II: α-Man II, fucosyltransférase: FucT, Hexosaminidase: HexNAcase.

c) Autres microalgues

Les processus de *N*-glycosylation d'autres microalgues ont également été étudiées. Parmi ces autres espèces de microalgues figurent notamment *Porphyridium sp, Botryococcus braunii, Euglena gracilis* et *Chlorella vulgaris.* Les structures de *N*-glycannes complexes majoritairement retrouvées chez ces microalgues sont résumées dans le **Tableau 5** suivant.

Tableau 5 : Structures des N-glycannes complexes majoritairement retrouvées chez d'autres microalgues.

Espèce	Structure du *N*-glycanne majoritaire	Référence
Porphyridium sp.		(Levy-Ontman et al., 2011)
Botryococcus braunii		(Schulze et al., 2017)
Euglena gracilis		(O'Neill et al., 2017)
Chlorella vulgaris		(Mócsai et al., 2019)

■: *N*-acétylglucosamine, ● : Mannose, ● : Galactose, ★ : Xylose, ▲ : Fucose, Me : Méthyl.

3) *O*-glycosylation chez les microalgues

L'étude des *O*-glycannes de *C. reinhardtii* a montré que la *O*-glycosylation se présenterait majoritairement sous la forme d'HRGPs à l'instar des structures présentes chez les plantes supérieures (Bollig et al., 2007; Nguema-Ona et al., 2014). Les *O*-glycannes de type HRGPs présents chez *C. reinhardtii* seraient en grande partie tri- ou tétraglycosylés avec de l'arabinose, du galactose et des méthyl-galactoses et méthyl-arabinoses (Bollig et al., 2007)(***Figure 18***). Les glycosyltransférases impliquées dans la synthèse de ces HRGPs n'ont pas encore clairement été identifiées. Il a, cependant, été proposé qu'une β(1,4)-arabinosyltransférase lierait un premier arabinose à l'hydroxyproline, puis une β(1,2)-arabinosyltransférase ajouterait le second résidu d'arabinose. Une β(1,2)-galactosyltransférase ajouterait, par la suite, un galactose sur le deuxième arabinose. Deux

méthyltransférases ajoutant des méthyles sur le carbone-6 du galactose et le carbone-3 de l'arabinose seraient également présentes.

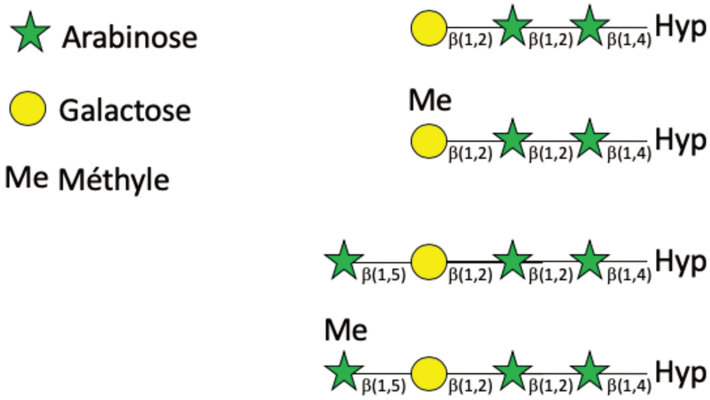


***Figure 18 : O-glycannes de type HRGPs retrouvés chez C. reinhardtii d'après* (Bollig et al., 2007).**

Schématisation des HRGPs présents chez C. reinhardtii. Un β(1,4)-arabinose est d'abord transféré sur l'hydroxyproline (Hyp) puis un β(1,2)-arabinose est transféré sur ce dernier. Unβ(1,2)-galactose est par la suite ajouté sur le deuxième arabinose. Un dernier résidu d'arabinose peut être ajouté sur le galactose. Des méthylations peuvent avoir lieu sur l'arabinose et le galactose en position terminale.

Concernant les autres microalgues, dont la *N*-glycosylation a été étudiée, aucune étude des voies de *O*-glycosylation n'a pour l'heure été entreprise.

VII) Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, cette thèse a eu pour objectif de continuer l'étude de la *N*-glycosylation de la microalgue verte *C. reinhardtii*. La *N*-glycosylation de cette espèce étant différente de celle retrouvée chez l'Homme, les travaux de thèse ont porté sur la modification de la *N*-glycosylation de la microalgue, afin que celle-ci puisse, à terme, produire des molécules recombinantes utilisables en thérapie humaine. Pour y parvenir, deux stratégies ont été utilisées, la transformation sur le génome nucléaire pour introduire des glycosyltransférases manquantes, et la mutation de glycosyltransférases non présentes dans la *N*-glycosylation humaine.

A) Complémentation avec des glycosyltranférases hétérologues

Comme l'a montrée l'étude des *N*-glycannes matures de *C. reinhardtii*, beaucoup d'étapes présentes dans la *N*-glycosylation humaine sont manquantes chez celle-ci. En effet, *C. reinhardtii* suit une voie de *N*-glycosylation indépendante de la GnT I, enzyme clé de la maturation des *N*-glycannes de mammifères, et synthétise majoritairement un glycanne

$Man_5GlcNAc_2$. La première étape en vue d'une humanisation de la *N*-glycosylation serait d'effectuer de la transgénèse sur la microalgue avec le gène responsable de l'expression de la GnT I pour générer un glycanne de type $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$. L'ajout du GlcNAc terminal permettra d'envisager les complémentations ultérieures avec l'α–mannosidase II, la GnT II et la GalT pour finaliser l'humanisation de la glycosylation chez *C. reinhardtii*, et pouvoir ainsi produire des protéines recombinantes avec une glycosylation compatible leur usage thérapeutique.

Le premier objectif de cette thèse vise à une meilleure compréhension de la voie de *N*-glycosylation chez *C. reinhardtii* et à l'initiation du processus d'humanisation des voies de *N*-glycosylation de *C. reinhardtii* par transformation avec le gène codant pour la GnT I d'*A. thaliana* et de *P. tricornutum,* respectivement. La mise en œuvre de cette approche a permis de mieux appréhender les structures des *N*-glycannes synthétisés par *C. reinhardtii* et de réviser la voie de *N*-glycosylation de la microalgue verte. L'ensemble des données obtenues font l'objet du chapitre I de la partie « résultats » dans ce manuscrit. La mise au point d'un protocole d'extraction des précurseurs glycanniques du RE a permis d'étudier la synthèse des précurseurs de *C. reinhardtii* et *P. tricornutum,* respectivement. Ces résultats font l'objet du chapitre II de la partie « résultats » dans ce manuscrit.

B) Utilisation de mutants de la *N*-glycosylation

En 2013, il a été mis en évidence que les *N*-glycannes complexes de *C. reinhardtii* etaient majoritairement composés d'oligomannosides pouvant porter deux résidus xylose et des groupements méthyles. Or, il a déjà été montré que les épitopes β(1,2)-xylose présents sur les *N*-glycannes de plantes peuvent induire une réaction immunitaire chez l'Homme et doivent, alors, être retirer pour optimiser la production de protéines recombinantes compatibles avec une utilisation en thérapie humaine (Bardor et al., 2003).

Récemment, des travaux de grande ampleur ont permis de créer une banque de mutants par insertion aléatoire dans le génome de *C. reinhardtii* de la cassette CIB1 conférant une résistance à un antibiotique, la paromomycine (Zhang et al., 2014). Cette banque de mutants créée en 2016 met aujourd'hui à disposition de la communauté scientifique plus de 60 000 mutants sur le site www.chlamylibrary.org.

L'utilisation de mutants des gènes Cre09.g391282 (XTA) et Cre16.g678997 (XTB), identifiés comme de potentielles xylosyltransférases de *C. reinhardtii,* serait utile pour carateriser et eliminer la xylosylation de cette microalgue. Récemment, une étude réalisée par Schulze et collaborateurs (Schulze et al., 2018) a permis de confirmer l'activité xylosyltranférase du gène Cre09.g391282 (XTA) par une approche glycoprotéomique. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude montrent que les xyloses sont présents en plus faibles quantités dans le mutant XTA que dans le sauvage. Des études complémentaires doivent, cependant, être faites, notamment, sur le gène XTB, afin d'éliminer complètement les xyloses sur le *N*-glycanne ainsi que de déterminer les localisations et liaison du deuxième xylose sur le *N*-glycanne de *C. reinhardtii*.

Le deuxième objectif de cette thèse vise, donc, à caractériser des mutants des xylosyltransférases (XTA et XTB) de *C. reinhardtii*. Ces travaux, résumés au niveau du chapitre III de la partie « résultats » de ce manuscrit, tentent d'établir le mode d'action de ces xylosyltransférases ainsi que d'évaluer l'impact de ces mutations sur la structure des glycannes résultants.

Chapitre I :

Réévaluation de la voie de *N*-glycosylation de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* suite à une tentative d'humanisation par expression hétérologue de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I).

<u>Chapitre I :</u> Réévaluation de la voie de *N*-glycosylation de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* suite à une tentative d'humanisation par expression hétérologue de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I).

Ce chapitre présente la première tentative d'humanisation de la voie de *N*-glycosylation de *C. reinhardtii* par expression d'une glycosyltransférase hétérologue, la *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I). Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal à comité de lecture intitulé « Scientific Reports » en septembre 2017.

Comme expliqué dans la synthèse bibliographique, la plupart des protéines d'intérêt thérapeutique présentes sur le marché pharmaceutique sont, en réalité, des glycoprotéines. Ceci implique que les cellules choisies comme système de production doivent être capables, non seulement, de synthétiser la protéine, mais aussi de réaliser des modifications post-traductionnelles, telles que la *N*-glycosylation. Par ailleurs, les motifs de *N*-glycosylation ajoutés par ces systèmes doivent être les plus proches possibles de ceux retrouvés chez l'homme afin d'éviter des réactions immunitaires. Mathieu-Rivet et collaborateurs ont montré, en 2013, que les structures *N*-glycanniques majoritairement retrouvées chez *C. reinhardtii* sont des glycannes de type oligomannosidiques avec des structures allant de deux à cinq résidus mannose et des glycannes complexes possédant un ou deux résidus xylose, ainsi que des méthylations. De plus, ces travaux ont montré chez cette microalgue que la GnT I, glycosyltransférase essentielle à la voie de *N*-glycosylation humaine pour ouvrir la voie à la formation des *N*-glycannes complexes, était absente. Sans l'action de la GnT I, la synthèse des *N*-glycannes complexes chez *C. reinhardtii* diffère de celle retrouvée chez les humains et les protéines thérapeutiques produites dans cet organisme ne peuvent pas être utilisées en thérapie humaine injectable.

Dans ce contexte, afin de produire des biomédicaments compatibles avec une utilisation en thérapie humaine, les GnT I d'*Arabidopsis thaliana* et de *Phaeodactylum tricornutum* ont été exprimées chez *C. reinhardtii* pour commencer à humaniser ses *N*-glycannes. Cependant, bien que les transformants obtenus synthétisent la GnT I, les analyses structurales de leurs *N*-glycannes ont démontré que la GnT I exprimée n'induit pas de modifications de la *N*-glycosylation de *C. reinhardtii*. La GnT I étant une glycosyltransférase capable de transférer du GlcNAc sur un substrat de type $Man_5GlcNAc_2$ branché, une différence structurale du $Man_5GlcNAc_2$ synthétisée par la microalgue a été supposée. Dès lors, les travaux

de recherche se sont ensuite focalisés sur l'analyse structurale détaillée de ce substrat. Ainsi, une caractérisation du glycanne $Man_5GlcNAc_2$ présent chez *C. reinhardtii* menée par une approche de spectrométrie de masse ESI-MS^n a montré que le *N*-glycanne diffère de celui présent chez les mammifères en adoptant une conformation linéaire. Ces analyses démontrent une différence structurale du $Man_5GlcNAc_2$ de *C. reinhardtii* par rapport au substrat de la GnT I, conduisant à une réévaluation des voies de *N*-glycosylation de la microalgue.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Received: 22 May 2017
Accepted: 14 August 2017
Published online: 31 August 2017

Heterologous expression of the *N*-acetylglucosaminyltransferase I dictates a reinvestigation of the *N*-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*

Gaëtan Vanier[1,8], Pierre-Louis Lucas[1], Corinne Loutelier-Bourhis[2], Jessica Vanier[1], Carole Plasson[1], Marie-Laure Walet-Balieu[3,4], Philippe Chan Tchi-Song[3,4], Isabelle Remy-Jouet[5], Vincent Richard[5], Sophie Bernard[1,6], Azeddine Driouich[1,6], Carlos Afonso[2], Patrice Lerouge[1], Elodie Mathieu-Rivet[1] & Muriel Bardor[1,7]

Eukaryotic *N*-glycosylation pathways are dependent of *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), a key glycosyltransferase opening the door to the formation of complex-type *N*-glycans by transferring a *N*-acetylglucosamine residue onto the $Man_5GlcNAc_2$ intermediate. In contrast, glycans *N*-linked to *Chlamydomonas reinhardtii* proteins arise from a GnTI-independent Golgi processing of oligomannosides giving rise to $Man_5GlcNAc_2$ substituted eventually with one or two xylose(s). Here, complementation of *C. reinhardtii* with heterologous GnTI was investigated by expression of GnTI cDNAs originated from Arabidopsis and the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. No modification of the *N*-glycans was observed in the GnTI transformed cells. Consequently, the structure of the $Man_5GlcNAc_2$ synthesized by *C. reinhardtii* was reinvestigated. Mass spectrometry analyses combined with enzyme sequencing showed that *C. reinhardtii* proteins carry linear $Man_5GlcNAc_2$ instead of the branched structure usually found in eukaryotes. Moreover, characterization of the lipid-linked oligosaccharide precursor demonstrated that *C. reinhardtii* exhibit a $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ dolichol pyrophosphate precursor. We propose that this precursor is then trimmed into a linear $Man_5GlcNAc_2$ that is not substrate for GnTI. Furthermore, cells expressing GnTI exhibited an altered phenotype with large vacuoles, increase of ROS production and accumulation of starch granules, suggesting the activation of stress responses likely due to the perturbation of the Golgi apparatus.

N-linked glycosylation is an extensive eukaryotic post-translational modification of secreted proteins consisting of the covalent attachment of an oligosaccharide onto asparagine residues belonging to the consensus sequence Asn-X-Ser/Thr/Cys, where X represents any amino acid except proline[1–4]. The process starts in the endoplasmic reticulum (ER) with the biosynthesis of a lipid-linked oligosaccharide (LLO) precursor which involves the action of a conserved set of enzymes named Asparagine-Linked Glycosylation (ALG). First steps of the LLO synthesis occur on the cytosolic face of the ER membrane where *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and mannose

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire végétale, EA 4358, 76000, Rouen, France. [2]Normandie Univ, UNIROUEN, COBRA, UMR 6014 et FR 3038, Université de Rouen, INSA de Rouen, CNRS, 76000, Rouen, France. [3]Normandie Univ, UNIROUEN, Plate-Forme de Protéomique PISSARO, 76000, Rouen, France. [4]Normandie Univ, UNIROUEN, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB), 76000, Rouen, France. [5]Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm UMR 1096, Plateforme BOSS, 76000, Rouen, France. [6]Normandie Univ, UNIROUEN, Plate-forme, PRIMACEN, Cell Imaging Platform of Normandy, 76000, Rouen, France. [7]Institut Universitaire de France (I.U.F.) 1, rue Descartes, 75231, Paris, Cedex 05, France. [8]Present address: UMR FARE 614, Fractionnement des AgroRessources et Environnement, Chaire AFERE, Université de Reims-Champagne-Ardenne, INRA, 51686, Reims Cedex, France. Gaëtan Vanier and Pierre-Louis Lucas contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.B. (email: muriel.bardor@univ-rouen.fr)

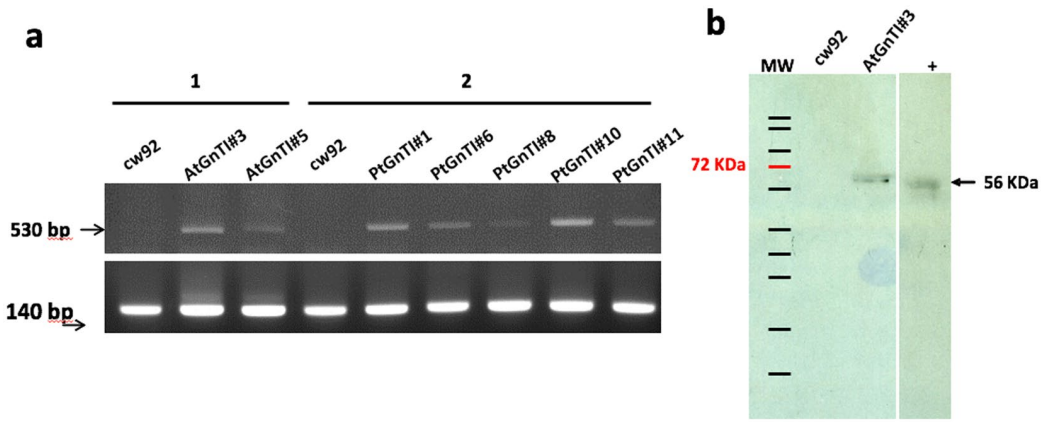


Figure 1. (**a**) RT-PCR analysis of *GnTI* transcription level in cw92 cells, cell lines transformed with *AtGnTI-V5* (lines AtGnTI#3 and AtGnTI#5) or *PtGnTI-V5* (lines PtGnTI#1, PtGnTI#6, PtGnTI#8, PtGnTI#10 and PtGnTI#11) using *AtGnTI* (1) or *PtGnTI* (2) specific primers. Actin (lower panel) was used as an RT-PCR control. (**b**) Immunodetection of recombinant GnTI in the microsomal fraction isolated from cw92 cells and AtGnTI#3 lines respectively. The immunodetection was performed using an anti-V5 antibody as a primary antibody. A protein extract from CHO cells expressing *PtGnTI-V5* (+) was used as a positive control[17]. Full images of the agarose gel and the Western blot are presented in Figs S1 and S2.

(Man) residues are added step by step onto a membrane-anchor dolichol pyrophosphate (Dol-PP) to form a $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol. Then, the $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol is flipped into the lumen of the ER[5,6] where its extension occurs by the addition of several Man and glucose (Glc) residues into a complete oligosaccharide precursor $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol[7]. This LLO is thereafter transferred by the oligosaccharyltransferase (OST) complex onto the asparagine of the *N*-glycosylation consensus sequence of the nascent polypeptides[8]. The *N*-glycan is then trimmed by the action of α-glucosidases I and II, and eventually an ER-mannosidase into $Man_{8\text{-}9}GlcNAc_2$ oligomannoside. During these ER events, interactions between the glycoprotein and ER-resident chaperones ensure the glycoprotein folding[9,10]. Correctly folded glycoproteins then enter the Golgi apparatus where their *N*-glycans are processed through the action of an α-mannosidase I into $Man_5GlcNAc_2$. Subsequently, *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), α-mannosidase II and finally *N*-acetylglucosaminyltransferase II (GnTII) give rise to the canonical $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ core common to mammals, insects and land plants[11,12]. This core undergoes further maturation into organism-specific complex-type *N*-glycans that are involved in several physiological functions like cell-cell interaction, intracellular communication and signaling[13,14].

The structures of *N*-linked glycans of the green microalgae *C. reinhardtii* were recently characterized[15]. Predominant *N*-glycans carried by *C. reinhardtii* endogenous proteins are oligomannosides ranging from $Man_2GlcNAc_2$ to $Man_5GlcNAc_2$. In addition, mature *N*-glycans were identified as oligomannosides $Man_4GlcNAc_2$ and $Man_5GlcNAc_2$ presenting methylation on mannose residues and substituted by one or two xylose residues[15]. The absence of terminal GlcNAc residues on these *N*-linked glycans suggested that mature *N*-glycans in *C. reinhardtii* are derived from GnTI-independent Golgi events[11,15]. *In silico* analysis of the *C. reinhardtii* genome allowed the identification of numerous candidate genes encoding enzymes of the protein *N*-glycosylation pathway, such as the ALG, OST subunits, glycosidases and glycosyltransferases involved either in the ER or Golgi *N*-glycan biosynthesis steps[11,15]. However, in agreement with biochemical analyses, no GnTI candidate is predicted in *C. reinhardtii* genome suggesting that the *N*-glycosylation pathway in this organism is different from that found in land plants, insects, mammals[12,16] and diatoms for which a functional GnTI has been recently characterized[17].

Considering the difference in the *N*-glycosylation pathways between *C. reinhardtii* and land plants, as well as between *C. reinhardtii* and diatoms, we have undertaken the expression of either a diatom or a plant GnTI in *C. reinhardtii* to investigate the effects of such a complementation on the physiology and *N*-glycan pathway in *C. reinhardtii*. Our findings demonstrate that the expression of GnTI induces stress responses in *C. reinhardtii* and reveal a truncated ER *N*-glycosylation pathway in *C. reinhardtii*.

Results

The commonly used cw92 laboratory strain was transformed with the codon optimized sequences encoding for the catalytically active GnTI from Arabidopsis (At*GnTI*) or from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Pt*GnTI*). Both have been shown to be able to process *N*-linked glycans. At*GnTI* (At4g38240) encodes for a Golgi enzyme that is responsible for the transfer of a terminal GlcNAc residue onto $Man_5GlcNAc_2$ *N*-glycan[18,19]. PtGnTI has been shown to restore *in vivo* the biosynthesis of complex-type *N*-glycans in CHO Lec1 mutant that lacks endogenous GnTI activity[17]. These sequences fused to a tag sequence encoding for a V5-epitope were used for nuclear expression in *C. reinhardtii*[20–22]. RT-PCR analyses show that both plant and diatom *GnTI* were expressed in *C. reinhardtii* transformed lines (Fig. 1 and Fig. S1). Further experiments were focused on two At*GnTI* and four Pt*GnTI* expressing lines, all of which exhibit the highest transcription levels (Fig. 1a). Furthermore, using anti-V5

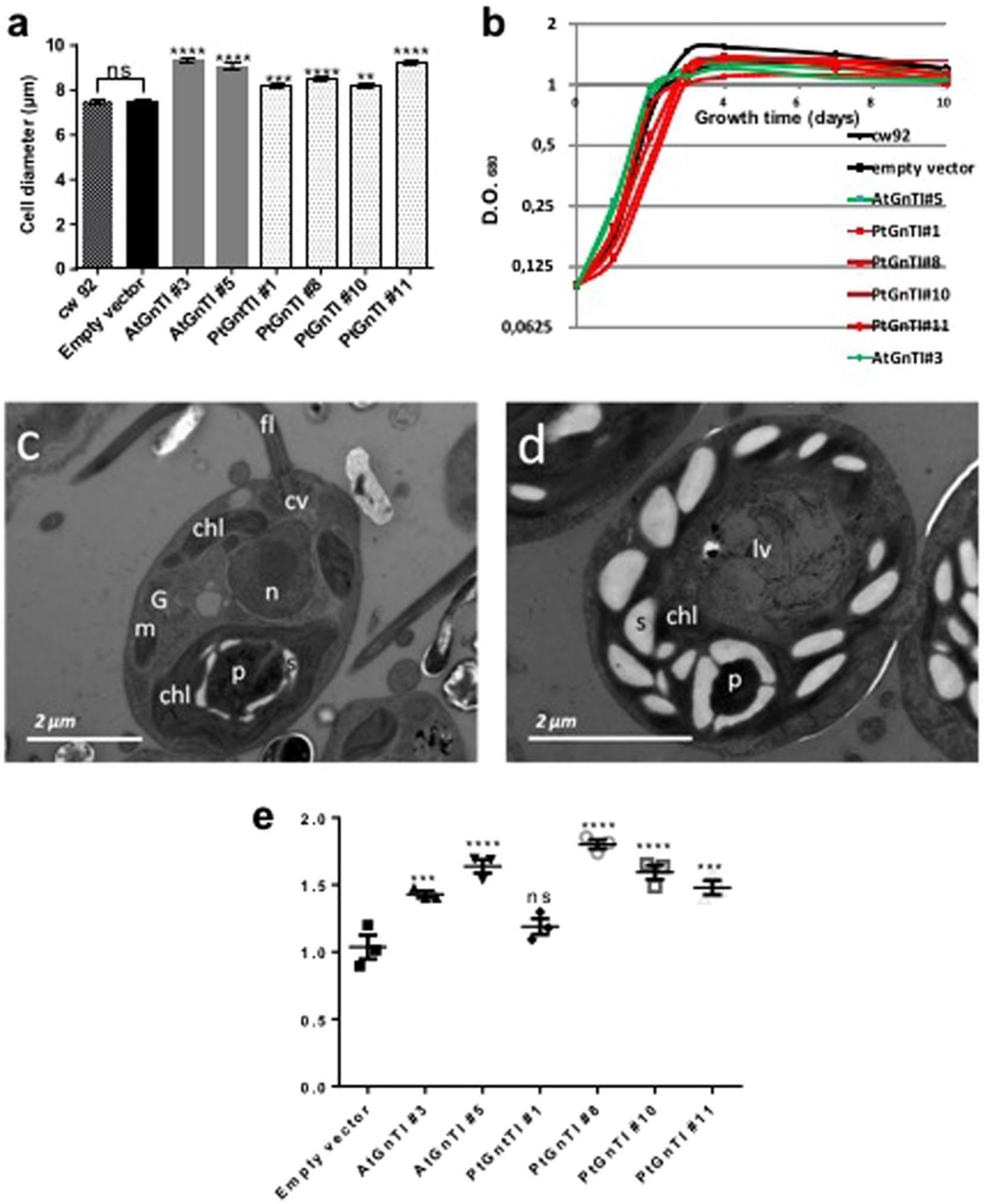


Figure 2. (**a**) Measurement of the cell diameters of *C. reinhardtii* cells expressing *AtGnTI* or *PtGnTI* as compared to the cw92 cells and cells transformed with an empty vector (Kruskal-Wallis test with $n > 200$ and p-value fixed at 0.05; stars indicate the significant level of the test). (**b**) Growth rate of cw92 and transformed cell lines grown in TAP medium. (**c,d**) Ultrastructure of cw92 cells (**c**) and transformed cell line AtGnTI#3 (**d**) by Transmission Electron Microscopy (TEM). chl: chloroplast, fl: flagella, G: Golgi apparatus, m: mitochondrion, n: nucleus, P: pyrenoid, s: starch granules, cv: contractile vacuoles, lv: large vesicles. (**e**) ROS levels in transformed cell lines determined through the oxidation measurement of CMH spin probe by electron paramagnetic resonance spectroscopy. The ROS level (arbitrary units/12×10^4 cells hour^{-1}) in each transformed cell line was normalized against ROS level measured in cw92 cells. After normalization, a statistical test was performed between GnTI expressing cell lines and cells transformed with the empty vector using Ordinary One-Way ANOVA with $n = 3$ and p-value fixed at 0.05.

epitope antibodies, a signal around 56 kDa was immunodetected on a western blot in the microsomal fraction isolated from the transgenic lines but not in that of the non-transformed cells (Fig. 1b and Fig. S2).

The phenotypic analysis of *C. reinhardtii* transformed cell lines revealed that the expression of At*GnTI* or Pt*GnTI* was correlated to a modification of the cell size. Indeed, measurements of longitudinal cell diameters showed that cells expressing At*GnTI* or Pt*GnTI* were statistically enlarged as compared to the cw92 cells and cells transformed with the empty vector (Fig. 2a). Despite the size difference, the growth rates of transformed cells

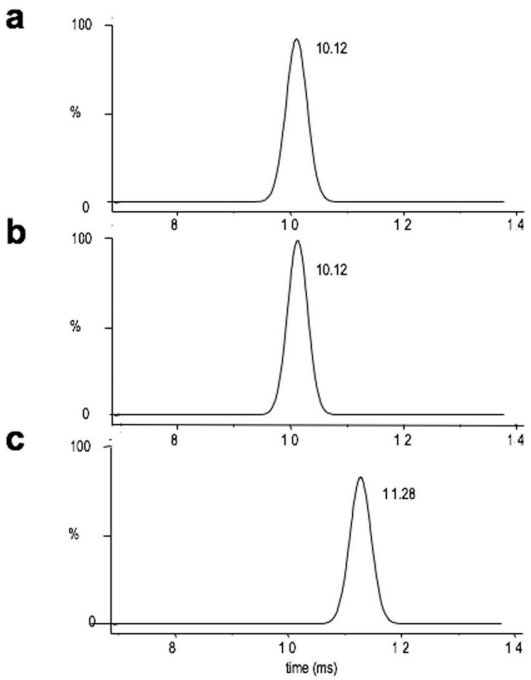


Figure 3. (**a**–**c**) Ion mobility spectra of $Man_5GlcNAc_2$-2AB derivatives prepared from two independent preparations of *C. reinhardtii* proteins (**a**,**b**) and bovine ribonuclease B (**c**) ($M + Na^+$ adducts).

were similar to those of cw92 cells indicating that the swelling observed in transformed lines did not alter cell growth (Fig. 2b).

To examine whether the ultrastructure of swollen cells is altered, cells were high pressure frozen and analyzed by thin-section electron microscopy. To further characterize the cell swelling, the ultrastructure of the transformed lines was analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM). As illustrated in Fig. 2c,d, GnTI expressing cells exhibited a large number of starch granules. In addition, large vesicles appeared in the GnT I expressing lines as compared to the cw92 and cells transformed with the empty vector. In order to check if the increase in size and the starch accumulation were associated to a stress phenotype in transformed cells, we measured the production of reactive oxygen species (ROS) in the different lines using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Figure 2e shows that ROS levels were significantly higher in the cells expressing At*GnTI* or Pt*GnTI* than in the cw92 cells, except for PtGnTI#1 line, in which ROS content was not significantly increased.

Protein *N*-glycosylation in cw92 and transformed cells were then investigated by mass spectrometry profiling. *N*-linked glycans were released from total protein extracts using PNGase F, labeled with 2-aminobenzamide (2AB) and analyzed by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometer (LC-ESI-MS). Although the expression of GnTI induced altered phenotypes in *C. reinhardtii*, the comparison of the *N*-glycan structures between cw92 cells and the transformed lines did not reveal any modification of the *N*-glycan profiles (Fig. S3). A specific search for mono- and discharged ions corresponding to *N*-glycans exhibiting extra terminal GlcNAc residue was unsuccessful. This suggested that the expression of At*GnTI* or Pt*GnTI* did not affect, in a detectable manner, the *N*-glycosylation of endogenous proteins in *C reinhardtii*.

Different scenarios may explain the inability of exogenous GnTI to affect the protein *N*-glycan profiles in *C. reinhardtii*. This may result from a very weak protein expression of active GnTI in the Golgi apparatus or its mislocalization in this organelle. Absence of the appropriate substrates in the Golgi apparatus could also explain the GnTI inactivity. This concerns the nucleotide-sugar (UDP-GlcNAc) or the oligomannoside $Man_5GlcNAc_2$ *N*-linked to secreted proteins. $Man_5GlcNAc_2$ oligomannoside was previously identified in *C. reinhardtii* cw92 proteins and was assigned to a branched $Man_5GlcNAc_2$ by analogy with data published regarding the Golgi *N*-glycan processing in eukaryotes[15]. The non-effect of GnTI on the *N*-glycan profiles from *C. reinhardtii* raised questions regarding the structure of this $Man_5GlcNAc_2$, which therefore needs to be reinvestigated. Here, we made use of Ion Mobility Spectrometry–Mass Spectrometry (IMS-MS), a reliable analytical method which allows the separation of isomers including oligosaccharide isomers[23–25]. In this analysis, the ion mobility of $Man_5GlcNAc_2$ coupled to 2AB oligosaccharide (sodium adduct) prepared from *C. reinhardtii* proteins was compared to the ion mobility of branched sodiated 2AB labeled $Man_5GlcNAc_2$ obtained from the bovine ribonuclease B. As illustrated in Fig. 3, $Man_5GlcNAc_2$-2AB from *C. reinhardtii* and from bovine ribonuclease B exhibited different ion mobilities (drift time of 10.12 ms and 11.28 ms, respectively) which suggested that they possess distinct structures. This data indicated that $Man_5GlcNAc_2$ in *C. reinhardtii* is different from the branched $Man_5GlcNAc_2$ that results from the trimming of oligomannosides $Man_{8\text{-}9}GlcNAc_2$ in the ER and the Golgi apparatus in plants and mammals.

The structure of *C. reinhardtii* $Man_5GlcNAc_2$ isomer was further investigated using electrospray ionization-multistage tandem mass spectrometry ($ESI\text{-}MS^n$) (with $n = 2$, $n = 3$ and $n = 4$) taking advantage of

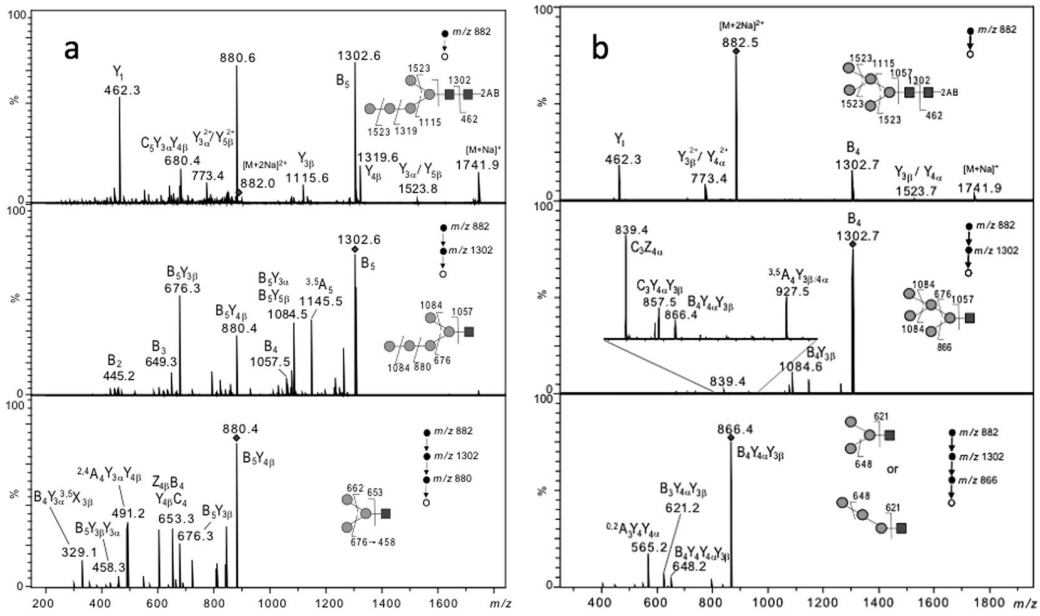


Figure 4. ESI-MS^n spectra with n = 2 (upper panel), n = 3 (middle panel) and n = 4 (lower panel) of permethylated $Man_5GlcNAc_2$-2AB derivative (*m/z* 882 corresponding to $[M + 2Na]^{2+}$ precursor ion) isolated from PtGnTI *C. reinhardtii* proteins (**a**) and from Ribonuclease B (**b**) On each panel, the precursor ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to one of the possible structures. 2AB: 2-aminobenzamide; Black square: GlcNAc; grey circle: Man.

specific ion transitions reported in ref. 26 (Table 1). Fragmentation patterns of the doubly charged $[M + 2Na]^{2+}$ of permethylated $Man_5GlcNAc_2$-2AB (*m/z* 882) prepared from proteins of PtGnTI#1 transformed line and from bovine ribonuclease B were compared (Fig. 4). The MS^3 "*m/z* 882 → *m/z* 1302 → product ions" analysis of PtGnTI#1 *N*-glycans revealed the presence of discriminant product ions *m/z* 880 and *m/z* 676 (Fig. 4a, middle panel) that are not detected for the permethylated $Man_5GlcNAc_2$-2AB released from bovine ribonuclease B (Fig. 4b, middle panel). Moreover, the MS^4 "*m/z* 882 → *m/z* 1302 → *m/z* 880 → product ions" analysis showed that *m/z* 880, which arose from the neutral loss of two terminal mannose residues from *m/z* 1302, fragments into *m/z* 676 (Fig. 4a, lower panel). Such a fragmentation pattern does not correspond to that of a branched $Man_5GlcNAc_2$ isomer, but to the one of a linear $Man_5GlcNAc_2$ structure[26] (Table 1). Similar fragmentation patterns were observed for permethylated $Man_5GlcNAc_2$-2AB prepared from cw92 cells and AtGnTI cells (Fig. S4). In contrast, the fragmentation pattern deduced from the MS^4 analysis of the *m/z* 882 for $Man_5GlcNAc_2$-2AB isolated from bovine ribonuclease B revealed the specific fragmentations *m/z* 882 → *m/z* 1302 → *m/z* 866 → *m/z* 648, as it is expected for the branched isomer of $Man_5GlcNAc_2$-2AB (Fig. 4b)[26] (Table 1). In conclusion, the comparison of ESI-MS^n fragmentation patterns suggested that *C. reinhardtii* proteins carry linear $Man_5GlcNAc_2$ (Fig. 5d) instead of the conventional branched isomer (Fig. 5c).

According to the *N*-glycan biosynthesis pathway described in land plants and mammals, a linear $Man_5GlcNAc_2$ is meant to exhibit terminal α(1,2/6)-Man residues instead of α(1,3/6)-Man. For further confirmation of the *C. reinhardtii* $Man_5GlcNAc_2$ topology, the *N*-glycan mixture was submitted to exoglycosidase degradations using either Jack bean mannosidase, a non-specific α-mannosidase and *Aspergillus saitoi* mannosidase, an exoglycosidase specific for α(1,2)-mannose residues[27]. $Man_5GlcNAc_2$-2AB from *C. reinhardtii* was efficiently converted into $ManGlcNAc_2$-2AB by Jack bean mannosidase after removal of the four α-mannose units. In contrast, $Man_3GlcNAc_2$-2AB was the major end product after treatment with *Aspergillus saitoi* α(1,2)-mannosidase that results from the removal of two terminal α(1,2)-mannose residues from the linear trimannoside arm (Fig. S5). Taken together, both mass spectrometry and enzyme sequencing analyses demonstrated that *C. reinhardtii* glycoproteins carry *a* non-canonical linear $Man_5GlcNAc_2$, as depicted in Fig. 5d.

The occurrence of a linear $Man_5GlcNAc_2$ oligosaccharide onto *C. reinhardtii* gycoproteins may result either from the trimming of $Man_{8\text{-}9}GlcNAc_2$ in the Golgi apparatus by the action of α-mannosidases or from a truncated biosynthesis of the LLO in the ER (Fig. 5). The latter hypothesis was investigated by isolation and analysis of *C. reinhardtii* LLO. LLO were isolated from cw92 microsomal preparations of *C. reinhardtii* using a methanol/chloroform extraction procedure according to a protocol adapted from[27,28]. The oligosaccharide was hydrolyzed from the PP-dolichol anchor by mild acidic cleavage and then permethylated as previously reported[27,29]. A predominant ion at *m/z* 2192.7 was observed using MALDI-TOF-MS and could be assigned to a permethylated oligosaccharide containing 8 hexoses and 2 HexNAc residues ($Hex_8HexNAc_2$) (Fig. S6). A minor ion at *m/z* 1987.6 could be assigned to $Hex_7HexNAc_2$ (Fig. S6). The sequence of this oligosaccharide was analyzed by ESI-MS^n and compared to the one isolated from LLO of the YG170 (*alg3*) yeast mutant (Fig. 6). Indeed, this strain lacks α1,3-mannosyltransferase ALG3 activity and accumulates $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ LLO in the ER[30,31]. Both ESI-MS^n data exhibited similar fragmentation patterns that are consistent with a linear arrangement in the oligosaccharide.

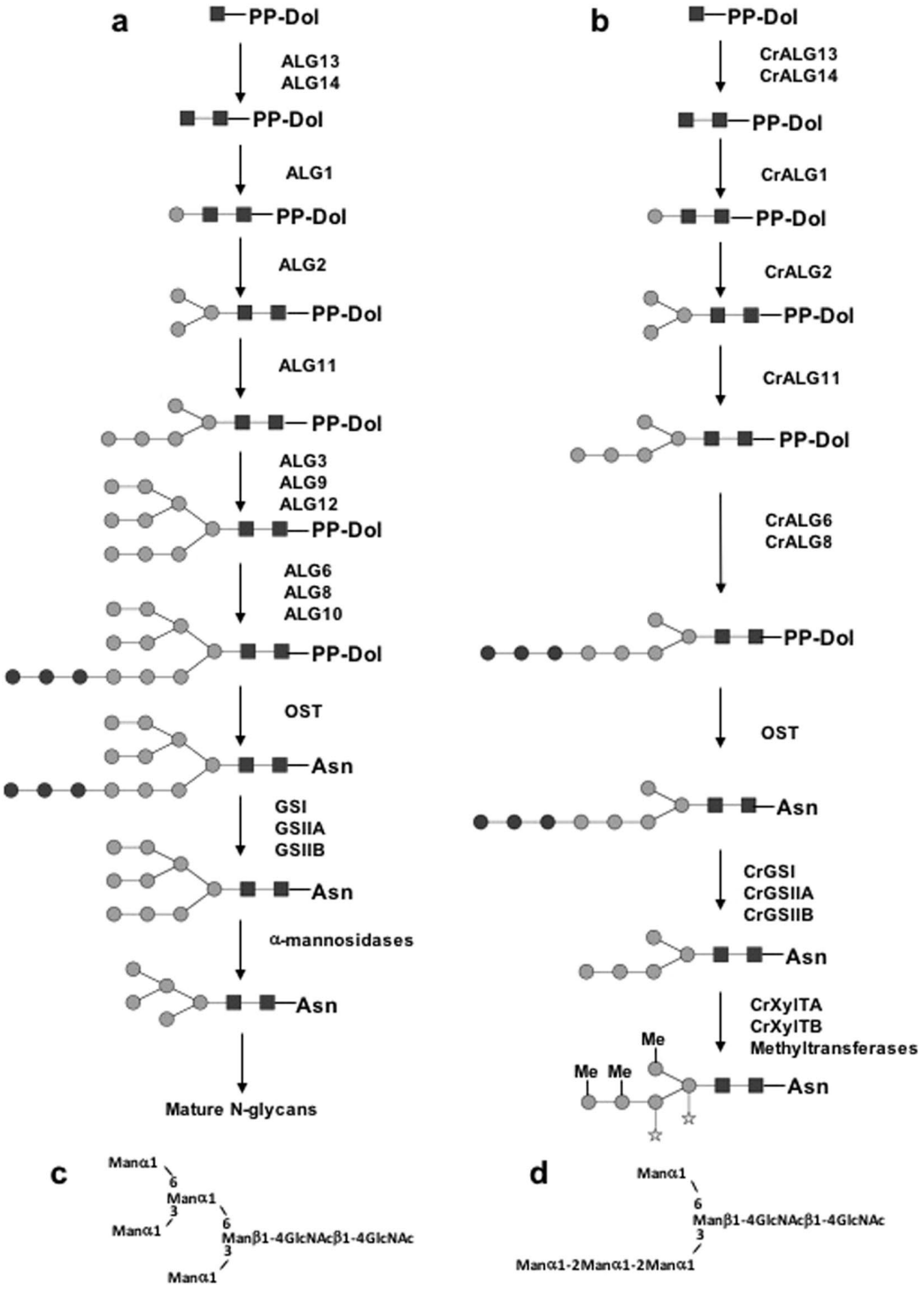


Figure 5. *N*-glycan biosynthesis in land plants and mammals (**a**) and proposed pathway in *C. reinhardtii* (**b**). Asn: asparagine residue of the *N*-glycosylation site (Asn-X-S/T/C). PP-Dol: dolichol pyrophosphate; Black square: GlcNAc; grey circle: Man; Star: xylose and Me: methyl substituent. Detailed structure of $Man_5GlcNAc_2$ in land plants and mammals (**c**) and in *C. reinhardtii* (**d**).

Taken together, these analyses demonstrated that *C. reinhardtii* accumulates a predominant linear truncated $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ LLO in the ER (Fig. 5b).

Discussion

In previous work, we characterized *N*-glycan structures linked to endogenous proteins in *C. reinhardtii* and showed they were mostly oligomannosides and for 30% novel mature structures containing xylose residues and

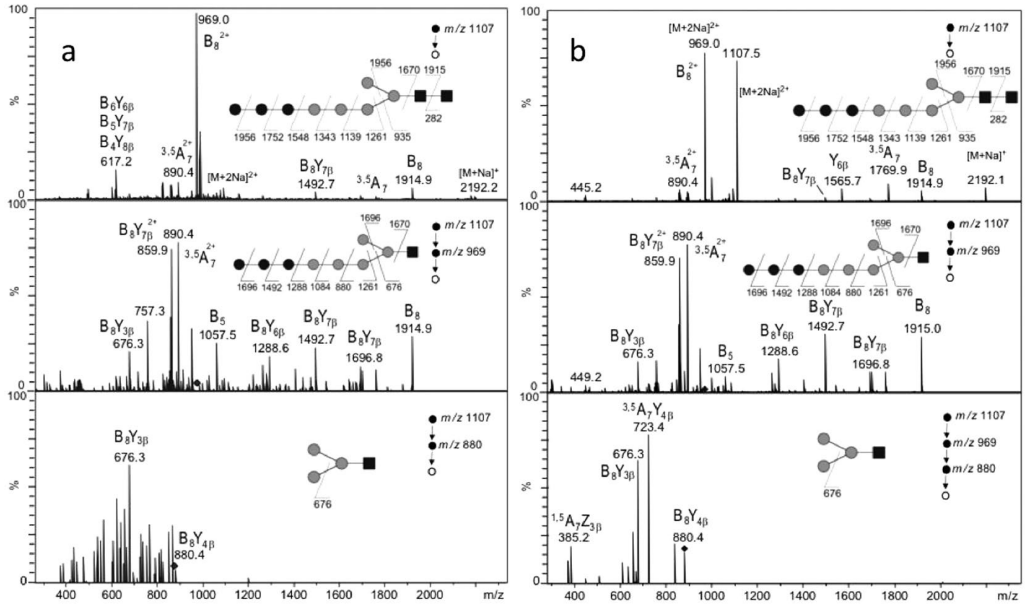


Figure 6. ESI-MS^n spectra with n = 2 (upper panel), n = 3 (middle panel + lower panel (a)) and n = 4 (lower panel (b)) of permethylated LLO derivative (*m/z* 1107 corresponding to $[M + 2Na]^{2+}$ precursor ion) from lipid-linked oligosaccharides of cw92 *C. reinhardtii* cells (**a**) and the YG170 yeast mutant cells (**b**). On each panel, the precursor ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed. Black square: GlcNAc; grey circle: Man; black circle: Glc.

methylated mannoses on $Man_{4\text{-}5}GlcNAc_2$[15]. These structures resulted from a Golgi GnTI-independent processing of oligomannosides as the bioinformatics analysis of the genome has revealed that it lacks GnTI. Furthermore, no *N*-glycan harboring terminal GlcNAc residues has been identified in the whole glycan population[11,15]. This situation contrasts with most eukaryotic organisms in which the GnTI is a key Golgi enzyme in the *N*-glycosylation pathway opening the door to the biosynthesis of structurally diverse mature *N*-glycans[12]. In this canonical pathway, the addition of a first GlcNAc by GnTI is required for the sequential activity of a large repertoire of other specific transferases giving rise to complex *N*-glycans involved in numerous biological processes, such as intracellular communication and signaling[13,14]. Inactivation of GnTI in those organisms induces strong developmental phenotypes. For instance, GnTI-null embryos of mouse die at about 10 days after fertilization indicating that mature *N*-glycans are required for morphogenesis in mammals[32,33]. Also, inactivation of GnTI reduces the viability in worm and fly[34,35]. In plants, GnT I mutants exhibit a stress phenotype, thus suggesting a role for mature *N*-glycans in specific physiological processes[36,37]. In rice, *gntI* mutants, impaired in the *N*-glycans maturation showed severe developmental defects, resulting in early lethality, associated to reduced sensitivity to cytokinin[36].

GnTI genes are predicted in different microalgae genomes. In the diatom *P. tricornutum*, PtGnTI was demonstrated to encode for an active glycosyltransferase[17]. Therefore, the capacity of *C. reinhardtii* to express GnTI from Arabidopsis and from *P. tricornutum* was analyzed to investigate whether *C. reinhardtii N*-glycan biosynthesis can be complemented with this key transferase and shift into a GnTI – dependent pathway. Moreover, in a biotech context, the production, in microalgae, of recombinant glycoproteins for therapeutic applications will require the engineering of their endogenous *N*-glycosylation pathway for the production of biopharmaceuticals exhibiting human-compatible *N*-glycans. Therefore, implementation of a GnTI - dependent pathway is a prerequisite for any production of glycosylated biopharmaceuticals in *C. reinhardtii*.

Transgenic lines expressing the Arabidopsis or diatom GnTI were obtained and GnTI protein was immunodetected as expected in the microsomal fraction. However, further experiments are required to confirm the GnTI localization within the Golgi apparatus. Mass spectrometry analyses of *N*-glycan profiles from proteins secreted in transgenic lines did not show any modification of the *N*-glycan population by comparison with the cw92 cells. Among the different scenarios that may explain this result, the absence of UDP-GlcNAc nucleotide sugar in the Golgi apparatus was first considered. The transport of the cytosolic nucleotide sugars across the Golgi membrane is performed by Nucleotide Sugar Transporters (NSTs). Searching for NST orthologues in the *C. reinhardtii* genome allowed the identification of 23 candidate genes of which the deduced amino-acid sequences harbor the characteristic Triose Phosphate Translocator (TPT) domain (Pfam 03151) present in NSTs (Mathieu-Rivet *et al.*, in press). However, as most of the characterized NSTs has been shown to transport at least two distinct substrates, determination of their specificity for nucleotide sugars based on sequence homologies with other Golgi NSTs remains difficult without additional biochemical evidence[38]. Therefore, further experimental work is needed to determine whether a specific Golgi UDP-GlcNAc transporter exists in *C. reinhardtii*. In relation to this, we cannot ruled out that the cytosolic abundance of UDP-GlcNAc may not be sufficient to supply the Golgi apparatus which would consequently limit GnTI in *C. reinhardtii*.

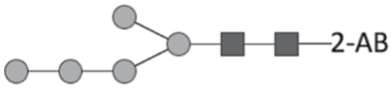
$Man_5GlcNAc_2$ topology	MS^n pathways
	a. 882* → 1302 (loss of 2AB) → 1084 (loss of terminal Man) → 866 (loss of terminal Man) → 676 (loss of Man)
	b. 882* → 1302 (loss of 2AB) → 1084 (loss of terminal Man) → 866 (loss of terminal Man) → 648 (loss of terminal Man)
	c. 882* → 1302 (loss of 2AB) → 1084 (loss of terminal Man) → 866 (loss of terminal Man) → 662 (loss of Man)
	d. 882* → 1302 (loss of 2AB) → 1084 (loss of terminal Man) → 880 (loss of Man) → 676 (loss of Man)

Table 1. Transition fragmentation ions observed in ESI-MS^n for the branched and linear $Man_5GlcNAc_2$-2AB according to ref. 26. *The selected ion at *m/z* 882 corresponding to $[M + 2Na]^{2+}$ precursor ion.

Inability of GnTI to affect the endogenous *N*-glycan population in *C. reinhardtii* transformed lines may also result from the absence of the appropriate glycan substrate. $Man_5GlcNAc_2$ oligomannoside was previously identified in *C. reinhardtii*[15] and considered as being the branched isomer substrate for GnTI by analogy with mammals and plants *N*-glycan pathways. Its structure was reinvestigated by mass spectrometry and enzyme sequencing and compared to a branched $Man_5GlcNAc_2$ standard from mammals[26]. Ion mobilities determined by IMS-MS and fragmentation patterns resulting from ESI-MS^n clearly show that *C. reinhardtii* and mammalian oligomannosides differ in their shape and sequence. Moreover, the fragmentation pattern determined by MS^n and enzyme digestion with an α(1,2)-mannosidase are consistent with the presence of a linear $Man_5GlcNAc_2$ on *C. reinhardtii* proteins as depicted in Fig. 5d. This oligosaccharide may result from a truncated LLO biosynthesis occurring in the ER (Fig. 5). Indeed, ALG3, ALG9 and ALG12 candidates are not predicted in the *C. reinhardtii* genome[15,39,40]. These ER enzymes are involved in the completion of the biosynthesis of the LLO precursor $Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol prior to its glucosylation (Fig. 5a). As a consequence, the absence of ALG3, ALG9 and ALG12 activities results in the secretion, from ER, of proteins carrying a linear $Man_5GlcNAc_2$ instead of $Man_{8\text{-}9}GlcNAc_2$ (Fig. 5b). In contrast, in land plants and mammals, branched $Man_5GlcNAc_2$ is obtained by the trimming of mannose residues of $Man_{8\text{-}9}GlcNAc_2$ oligomannosides by Golgi α-mannosidases (Fig. 5a). However, linear $Man_5GlcNAc_2$ oligomannoside could also result from the trimming of $Man_{8\text{-}9}GlcNAc_2$ by Golgi α-mannosidases predicted in *C. reinhardtii* genome[11,15] but having different glycan specificities as compared to those of homologous enzymes involved in mammalian and plant *N*-glycan pathways. To discriminate between the two possibilities, *C. reinhardtii* LLO was isolated, characterized by mass spectrometry analysis and compared with the one extracted from the ALG3 deficient yeast mutant[31]. These analyses demonstrated that this microalga accumulates a linear $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ (Fig. 6 and Fig. S6). Such a truncated ER pathway has been already characterized in some unicellular organisms such as the coccidian parasites Toxoplasma and Cryptosporidium[41–45]. In conclusion, data obtained in this study revealed a truncated ER *N*-glycan pathway in *C. reinhardtii* and required the reevaluation of the previously published *N*-glycan pathway[15]. In this reassessed *N*-glycan processing, $Man_5GlcNAc_2$ results from the deglucosylation of $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ precursor in the ER and its methylation and xylosylation in the Golgi apparatus (Fig. 5). Location of xylose residues on $Man_5GlcNAc_2$ was reinvestigated by ESI-MS^n (Fig. S7). This analysis confirmed the presence of the first xylose residue onto the β-Man[15]. In addition, the second xylose could be positioned either

on the α(1, 3)-linked Man (I) or the first α(1, 2)-linked Man (II). MS^4 experiments are more consistent with the structure I depicted in Fig. 5.

Surprisingly, cells expressing *GnTI* exhibited an altered phenotype although no modification of the *N*-glycans has been observed. The presence of large vacuoles as well as the increase of ROS production observed in transformed cell lines suggested that transformation with *GnTI* induced the activation of stress responses such as autophagy and oxidative stress[46,47]. Previously, Pérez-Martin and collaborators showed that ER stress caused by tunicamycin or DTT triggers autophagy[48]. It can be hypothesized that AtGnTI or PtGnTI may localize in the ER of *C. reinhardtii*. Indeed, a previous study published by Schoberer and coworkers in 2009 demonstrated that overexpressed GnTI in tobacco recruit the ER protein Sar1p resulting in a GnTI-Sar1p association in the ER membranes[49].

In addition, chlamydomonas cells expressing At*GnTI* or Pt*GnTI* accumulate starch. In BY2 cells and *chlamydomonas noctigama*, Hummel and collaborators[50] reported in 2010 that the disassembly of the Golgi apparatus using the secretion inhibitor Brefeldin A (BFA) caused the accumulation of plastid starch. This starch increase was also observed when the CopII-mediated ER to Golgi transport was inhibited in tobacco plants expressing a dominant negative version of the small GTPase Sar1p[51]. Moreover, it was proposed that disruption of the Golgi apparatus resulting in the loss of secretory activity may cause the redirection of free carbohydrates to the plastids where they would be converted into starch[51].

Therefore, we postulate here that the heterologous expression of *GnTI* may affect Golgi organization or the endosomal system, which would consequently disturb the biosynthesis of glycans or glycoconjugates and the cell biology of *C. reinhardtii*. Additional work and phenotypic studies of transformants expressing a non-functional GnTI would allow the confirmation of this hypothesis.

Methods

Strains and growth conditions. CC-503 cw92 strain, later called cw92 cells, was obtained from the Chlamydomonas Culture Collection at Duke University (Durham, NC, USA) and grown in batch cultures at 25 °C, illuminated with 150 μmol m^{-2} s^{-1} using TAP medium redirection of free carbohydrates to the plastids where they would be converted into starch[52].

Vector construction and transformation. The sequences encoding for At*GnTI* (At4g38240) and Pt*GnTI* (gi: 307604450) fused to the V5 epitope[17] were codon optimized and synthesized by Sloning Biotechnology. Optimized sequences were cloned as a XbaI/NdeI fragment in the pSL18 vector[53]. pSL18 (empty vector), pSL18-At*GnT*I or pSL18-Pt*GnT*I construct was introduced using the glass beads method[54]. To detect the transgene in genomic DNA, screening was performed by PCR using V5-reverse GGAGTCCAGGCCCAGCAGG and with At*GnTI*-forward GCCCTAAGTGGCCAAGGC or Pt*GnT1*-forward CCAGTCCAAGTGGCCGGGC as primers.

RT-PCR analysis. Total RNA were isolated from fresh cell pellets (1.5×10^6 cells), using TRIzol (Invitrogen). gDNA contamination was removed by a Turbo DNase treatment (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription was performed on 2 μg of RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). The transcription level of At*GnTI* and Pt*GnTI* transgenes was analyzed by PCR using the V5-reverse primer, with either At*GnTI*-forward or Pt*GnT1*-forward primers. Each PCR contained 2 μL of diluted cDNA (1/10), 0.8 mM of each primer, 0.25 mM dNTPs and 0.6 U GoTaq polymerase (Promega) and was performed in the reaction buffer provided by the manufacturer, according the following program: 95 °C for 5 min, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 62 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and a final step of 72 °C for 5 min. The expression of the actin gene was monitored as a control using CrActin-forward CGCTGGAGAAGACCTACGAG and CrActin-reverse GGAGTTGAAGGTGGTGTCGT as primers.

Microsomal preparations and Western-blot analysis. 1.4×10^7 of *C. reinhardtii* cells were collected (2,500 g for 5 min) and washed with a 20 mM potassium phosphate buffer at pH 7.4. All the following preparation steps were carried out at 4 °C. The cell pellet was broken with 2 mL of protease inhibitor cocktail 25X (Roche) dissolved in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) using the FastPrep-24™ 5G[15]. Samples were then spun (300 g for 3 min) in order to remove intact cells and debris. The supernatant was collected and centrifuged (20,000 g for 30 min) in order to eliminate pigments and chloroplasts. Finally, the supernatant was ultracentrifuged (100,000 g for 1 h) to pellet the microsomal fraction. Immunodetection using anti-V5 antibodies has been performed as described in ref. 17.

***N*-glycans preparation and derivatization.** Total proteins were extracted and deglycosylated using Peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) as described in ref. 15. The released *N*-glycans were then labeled with 2-aminobenzamide (2AB) according to ref. 55. Excess of reagent was removed using a cartridge D1 from Ludger. Freeze dried samples were resuspended in 10 μL of water. Jack bean mannosidase (Sigma M7944) or *Aspergillus saitoi* α(1,2)-mannosidase (ProZyme) enzymatic treatments were performed on 4.5 μL of 2AB-labeled *N*-glycans according to the manufacturer's instructions.

Permethylation - The 2AB-labeled *N*-glycans were permethylated[29] and cleaned-up according to ref. 56.

LC-ESI-MS. The analyses were performed using the nano-LC1200 system coupled to a QTOF 6550 mass spectrometer equipped with a nanospray source and a LC-Chip Cube interface (Agilent Technologies, les Ulis, France). Briefly, 2AB-labeled *N*-glycans were enriched and desalted on a 500 nL PGC trap column and separated on a PGC (3-μm particle size) column (150 mm long × 75 μm inner diameter, Agilent Technologies). A 30-min linear gradient (5–75% acetonitrile in 0.1% formic acid) at a flow rate of 400 nL min^{-1} was used. Separated

N-glycans were analyzed with the QTOF analyser. Full autoMS scans from 290 to 1,700 m/z and autoMS/MS from 59 to 1,700 *m/z* were recorded. In every cycle, a maximum of 5 precursors sorted by charge state (1+ and 2+ preferred) were isolated and fragmented in the collision cell with fixed collision cell energy at 15 eV. Scan speed raise based on precursor abundance (target 5,000 counts/spectrum) and precursors sorted only by abundance. Active exclusion of precursors was enabled and the threshold for precursor selection was set to 1,000 counts. The ESI acquisition parameters in positive mode were: capillary voltage; 1.9 kV, drying gas temperature; 250 °C, gas flow (air); 11 L min^{-1}; fragmentor voltage, 360 V; Skimmer1 voltage, 65 V and OctopoleRFPeak voltage, 750 V.

IM-MS analyses. The ESI-IM-MS experiments were performed using a Waters SYNAPT G2 hybrid quadrupole/HDMS instrument equipped with an ESI LockSpray™ source, the MassLynx 4.1 and the DriftScope 2.2 softwares (Waters, Manchester, UK). The SYNAPT HDMS system was calibrated using sodium formate cluster ions (2 mg mL^{-1}) and operated in 'V' resolution mode (resolution 20,000 FWHM). The ESI parameters were in positive ion mode: capillary voltage, 3 kV; sample cone voltage, 70 V; source temperature, 90 °C; desolvation temperature, 250 °C; desolvation gas flow (N_2), 700 L h^{-1}. The data were acquired using a 50–2000 *m/z* range with 1 s scan time and 0.02 s interscan delay. Sample solutions were infused into the source at a flow rate of 400 µL h^{-1} with a syringe pump (Cole-Palmer, Vernon Hills, Illinois, USA). The IMS conditions were optimized as followed: gas flow (N_2), 90 mL min^{-1}; IMS pressure, 3.05 mbar; wave height voltage, 40 V and T-wave velocity, 550 m s^{-1}. The ion mobility spectra were fitted using the Origin 9.0 software (OriginLab).

ESI-MS^n analyses. Permethylated 2AB-derivatives of *N*-glycans were analyzed by ESI-MS^n (n = 1 to 4) using a Bruker HCT Ultra ETD II quadrupole ion trap (QIT) mass spectrometer equipped with the Esquire control 6.2 and Data Analysis 4.0 softwares (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The ESI parameters were as followed: capillary and end plate voltages respectively set at −3.5 kV and −3.0 kV in positive ion mode, skimmer and capillary exit voltages set at 40 V and 200, respectively, nebulizer gas (N_2), pressure, drying gas (N_2) flow rate and drying gas temperature were 10 psi, 7.0 L min^{-1} and 300 °C, respectively. Helium pressure in the ion trap was 1.2×10^{-5} mbar. The data were acquired using a 200–2200 *m/z* range, using a scan speed of 8,000 m/z per second. The number of ions entering the trap cell was automatically adjusted by controlling the accumulation time using the ion charge control (ICC) mode (target 200,000) with a maximum accumulation time of 50 ms. The injection low-mass cut-off (LMCO) value was *m/z* 100 for $Man_5GlcNAc_2$ derivatives and 140 for LLO precursor respectively. The values of spectra averages and rolling average were 6 and 2. ESI-MS^n experiments were carried out by collision-induced dissociation (CID) using helium as the collision gas, isolation width of 2 *m/z* unit for the precursor ions and for the intermediate ions using a resonant excitation frequency with an amplitude from 0.8 to 1.0 Vp–p. Sample solutions were infused into the source at a flow rate of 300 µL h^{-1} by means of a syringe pump (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, USA).

Electron microscopy. High pressure freezing was performed with the freezer HPM100 Leica-microsystems. Prior to freezing, 72 h old *C. reinhardtii* cells were treated at room temperature 1 hour with 100 mM mannitol as cryoprotectant diluted in fresh culture medium. Pre-treated *C. reinhardtii* cells were transferred into an aluminium cryocapsule covered by soy lecithin dissolved at 100 mM in chloroform. Excess medium was absorbed by filter paper. After fixation on the loading device, samples were frozen according to a maximum cooling rate of 20,000 °C s^{-1} and a pressure of 2,100 bars. Samples were transferred to a freeze substitution automate (AFS2, Leica) pre-cooled to −110 °C. Samples were substituted in anhydrous acetone with 0.5% uranyl acetate and 0.5% osmium tetroxide at −90 °C for 72 h. The temperature was gradually raised to −60 °C using a gradient of +2 °C h^{-1} and stabilized during 12 h, then gradually raised to −30 °C by using the same gradient during 12 h and gradually raised again to +4 °C. Then, samples were rinsed twice at room temperature with anhydrous acetone. Infiltration was then processed in acetone-Spurr's resin (Spurr 25%, 8 h at +4 °C; Spurr 50%, 16 h at +4 °C; Spurr 75%, 8 h at room temperature; Spurr 100%, 16 h at room temperature; Spurr 100%, 24 h at room temperature). The Spurr's resin was finally polymerised at +50 °C during 24 h. Ultrathin sections (70 nm; ultracut UC6, Leica) were collected onto carbon-formvar-coated nickel grids. A classical staining using 0.5% uranyl acetate and 0.5% lead citrate was done before sections were observed in a Philips, FEI Tecnai 12 Biotwin transmission electron microscope operating at 80 kV, with ES500W Erlangshen CCD camera (Gatan).

Size measurements. Cells (1.5×10^7) were collected (4,500 g for 5 min). The cell pellet was incubated in TAP medium containing 4% of paraformaldehyde (PAF) (v/v) during 30 min, under shaking, at room temperature. Then, cells were washed four times and finally resuspended in 200 µL of TAP. 20 µL of fixed cells were spotted between slide and coverslip (Superfrost™ Plus, Thermo Scientific) and were observed with a Leica DMI-6000B inverted microscope at magnification 400. Cell size was determined using fixed cells by measuring the cell longitudinal diameter with Image J software. The measurements were done in triplicates on a minimum of 200 cells (n > 200).

Reactive oxygen species measurement. Reactive oxygen species (ROS) production was evaluated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Cells were incubated at room temperature in the dark for 60 min in Krebs-HEPES buffer containing 5 µM diethyl dithiocarbamate, 25 µM deferoxamine, and the spin probe 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine hydrochloride (CMH; 500 µM; Noxygen, Elzach, Germany). Spectra of the oxidized product of CMH (CM.) were recorded from frozen samples with a X-band spectrometer (MS-400; Magnetech, Berlin, Germany) with the following acquisition parameters: microwave power, 1 mW; modulation amplitude, 5 G; sweep time, 60 s; and 1 scans. After correction of the baseline, the total amplitude of the signal was measured and expressed in arbitrary units produced per 12×10^4 cells for 60 min. After EPR analyses, total chlorophyll was quantified for each sample according to ref. 57. The quantity

of total chlorophyll was used to normalize the signal intensity evaluated by EPR for each sample. The results were statistically analyzed using GraphPad Prism® software. The ROS level in each transformed cell line was normalized against ROS level measured in cw92 cells. To determine the significant level, a statistical test was performed between the GnTI transformed cell lines and the lines transformed with the empty vector using Ordinary One-Way ANOVA with n = 3 and p-value fixed at 0.05.

LLO preparation. The LLO extraction was performed on microsomal fractions from *C. reinhardtii* according to a protocol adapted from[27,28]. Released oligosaccharides were then lyophilized and resuspended in 500 µL of water and purified on a carbograph column (Hypersep Hypercarb, Thermo Scientific) using the manufacturer's instructions.

References

1. Austen, B. M. & Marshall, R. D. Acid dissociation constants of glycopeptides. *Biochem. J.* **163**, 31–38 (1977).
2. Gavel, Y. & von Heijne, G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* **3**, 433–442 (1990).
3. Gil, G.-C., Velander, W. H. & Van Cott, K. E. N-glycosylation microheterogeneity and site occupancy of an Asn-X-Cys sequon in plasma-derived and recombinant protein C. *PROTEOMICS* **9**, 2555–2567 (2009).
4. Matsui, T. *et al*. N-glycosylation at noncanonical Asn-X-Cys sequences in plant cells. *Glycobiology* **21**, 994–999 (2011).
5. Helenius, J. *et al*. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* **415**, 447–450 (2002).
6. Helenius, J. & Aebi, M. Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. - PubMed – NCBI, Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12137737. (Accessed: 28th March 2016) (2002).
7. Aebi, M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 2430–2437 (2013).
8. Mohorko, E., Glockshuber, R. & Aebi, M. Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 869–878 (2011).
9. Williams, D. B. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **119**, 615–623 (2006).
10. Määttänen, P., Gehring, K., Bergeron, J. J. M. & Thomas, D. Y. Protein quality control in the ER: The recognition of misfolded proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 500–511 (2010).
11. Mathieu-Rivet, E. *et al*. Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals. *Frontiers in plant science, section Plant Physiol.* **5**, 359 (2014).
12. Strasser, R. Plant protein glycosylation. *Glycobiology* cww023 (2016).
13. Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97–130 (1993).
14. Gagneux, P. & Varki, A. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* **9**, 747–755 (1999).
15. Mathieu-Rivet, E. *et al*. Exploring the N-glycosylation pathway in Chlamydomonas reinhardtii unravels novel complex structures. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3160–3183 (2013).
16. Lerouge, P. *et al*. in *Protein Trafficking in Plant Cells* 31–48 (Springer, 1998).
17. Baïet, B. *et al*. N-Glycans of Phaeodactylum tricornutum Diatom and Functional Characterization of Its N-Acetylglucosaminyltransferase I Enzyme. *J. Biol. Chem.* **286**, 6152–6164 (2011).
18. Strasser, R. *et al*. Molecular cloning and characterization of cDNA coding for beta1, 2N-acetylglucosaminyltransferase I (GlcNAcTI) from Nicotiana tabacum. *Glycobiology* **9**, 779–785 (1999).
19. Wenderoth, I. & von Schaewen, A. Isolation and characterization of plant N-acetyl glucosaminyltransferase I (GntI) cDNA sequences. Functional analyses in the Arabidopsis cgl mutant and in antisense plants. *Plant Physiol.* **123**, 1097–1108 (2000).
20. Fuhrmann, M. *et al*. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in Chlamydomonas reinhardtii by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol. Biol.* **55**, 869–881 (2004).
21. Fuhrmann, M., Oertel, W. & Hegemann, P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in Chlamydomonas reinhardtii†. *Plant J.* **19**, 353–361 (1999).
22. Shao, N. & Bock, R. A codon-optimized luciferase from Gaussia princeps facilitates the *in vivo* monitoring of gene expression in the model alga Chlamydomonas reinhardtii. *Curr. Genet.* **53**, 381–388 (2008).
23. Pagel, K. & Harvey, D. J. Ion mobility-mass spectrometry of complex carbohydrates: collision cross sections of sodiated N-linked glycans. *Anal. Chem.* **85**, 5138–5145 (2013).
24. Struwe, W. B., Pagel, K., Benesch, J. L. P., Harvey, D. J. & Campbell, M. P. GlycoMob: an ion mobility-mass spectrometry collision cross section database for glycomics. *Glycoconj. J.* **33**, 399–404 (2016).
25. Zhu, F., Lee, S., Valentine, S. J., Reilly, J. P. & Clemmer, D. E. Mannose7 glycan isomer characterization by IMS-MS/MS analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 2158–2166 (2012).
26. Prien, J. M., Ashline, D. J., Lapadula, A. J., Zhang, H. & Reinhold, V. N. The High Mannose Glycans from Bovine Ribonuclease B Isomer Characterization by Ion Trap MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 539–556 (2009).
27. Garénaux, E. *et al*. The Dual Origin of *Toxoplasma gondii N* -Glycans†. *Biochemistry (Mosc.)* **47**, 12270–12276 (2008).
28. Pabst, M. *et al*. Isomeric analysis of oligomannosidic N-glycans and their dolichol-linked precursors. *Glycobiology* **22**, 389–399 (2012).
29. Ciucanu, I. & Kerek, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res* **131**, 209–217 (1998).
30. Huffaker, T. C. & Robbins, P. W. Yeast mutants deficient in protein glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 7466–7470 (1983).
31. Zufferey, R. *et al*. STT3, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity *in vivo*. *EMBO J.* **14**, 4949–4960 (1995).
32. Ioffe, E. & Stanley, P. Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 728–732 (1994).
33. Metzler, M. *et al*. Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development. *EMBO J.* **13**, 2056–2065 (1994).
34. Sarkar, M. *et al*. Null Mutations in Drosophila N-Acetylglucosaminyltransferase I Produce Defects in Locomotion and a Reduced Life Span. *J. Biol. Chem.* **281**, 12776–12785 (2006).
35. Schachter, H. Mgat1-dependent N-glycans are essential for the normal development of both vertebrate and invertebrate metazoans. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 609–615 (2010).
36. Fanata, W. I. D., Lee, K. H. & Son, B. H. N-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in Oryza sativa. *Plant J.* **73**, 966–979 (2013).
37. Kang, J. S. *et al*. Salt tolerance of Arabidopsis thaliana requires maturation of N-glycosylated proteins in the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5933–5938 (2008).

38. Orellana, A., Moraga, C., Araya, M. & Moreno, A. Overview of Nucleotide Sugar Transporter Gene Family Functions Across Multiple Species. *J. Mol. Biol.* **428**, 3150–3165 (2016).
39. Gomord, V. *et al.* Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production: PMP-specific glycosylation patterns. *Plant Biotechnol. J.* **8**, 564–587 (2010).
40. Levy-Ontman, O. *et al.* Genes Involved in the Endoplasmic Reticulum N-Glycosylation Pathway of the Red Microalga Porphyridium sp.: A Bioinformatic Study. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 2305–2326 (2014).
41. Fauquenoy, S. *et al.* Proteomics and Glycomics Analyses of N-Glycosylated Structures Involved in Toxoplasma gondii-Host Cell Interactions. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 891–910 (2008).
42. Haserick, J. R., Leon, D. R., Samuelson, J. & Costello, C. E. Asparagine-Linked Glycans of Cryptosporidium parvum Contain a Single Long Arm, Are Barely Processed in the Endoplasmic Reticulum (ER) or Golgi, and Show a Strong Bias for Sites with Threonine. *Mol. Cell. Proteomics* **16**, S42–S53 (2017).
43. Luk, F. C. Y., Johnson, T. M. & Beckers, C. J. N-linked glycosylation of proteins in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Mol. Biochem. Parasitol.* **157**, 169–178 (2008).
44. Samuelson, J. *et al.* The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1548–1553 (2005).
45. Samuelson, J. & Robbins, P. W. Effects of N-glycan precursor length diversity on quality control of protein folding and on protein glycosylation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **41**, 121–128 (2015).
46. Pérez-Pérez, M. E., Couso, I. & Crespo, J. L. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga Chlamydomonas reinhardtii. *Autophagy* **8**, 376–388 (2012).
47. Pérez-Pérez, M. E. & Crespo, J. L. Autophagy in the model alga Chlamydomonas reinhardtii. *Autophagy* **6**, 562–563 (2010).
48. Pérez-Martín, M., Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D. & Crespo, J. L. Oxidative stress contributes to autophagy induction in response to endoplasmic reticulum stress in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Physiol.* **166**, 997–1008 (2014).
49. Schoberer, J. *et al.* Arginine/Lysine Residues in the Cytoplasmic Tail Promote ER Export of Plant Glycosylation Enzymes. *Traffic* **10**, 101–115 (2009).
50. Hummel, E., Osterrieder, A., Robinson, D. G. & Hawes, C. Inhibition of Golgi function causes plastid starch accumulation. *J. Exp. Bot.* **61**, 2603–2614 (2010).
51. Hummel, E., Schmickl, R., Hinz, G., Hillmer, S. & Robinson, D. G. Brefeldin A action and recovery in Chlamydomonas are rapid and involve fusion and fission of Golgi cisternae. *Plant Biol. Stuttg. Ger.* **9**, 489–501 (2007).
52. Harris, E. H. The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use. Academic Press (2009).
53. Depège, N., Bellafiore, S. & Rochaix, J.-D. Role of Chloroplast Protein Kinase Stt7 in LHCII Phosphorylation and State Transition in Chlamydomonas. *Science* **299**, 1572–1575 (2003).
54. Kindle, K. L. High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 1228–1232 (1990).
55. Séveno, M. *et al.* Plant N-glycan profiling of minute amounts of material. *Anal. Biochem.* **379**, 66–72 (2008).
56. North, S. J. *et al.* Glycomics Profiling of Chinese Hamster Ovary Cell Glycosylation Mutants Reveals N-Glycans of a Novel Size and Complexity. *J. Biol. Chem.* **285**, 5759–5775 (2010).
57. Arnon, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiol.* **24**, 1–15 (1949).

Acknowledgements

The authors acknowledge the University of Rouen Normandie, the Région Normandie, the Institut Universitaire de France (I.U.F.), the European regional development fund (ERDF) No. 31708 and the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029) for financial support. They thank Prof Dr. Markus Aebi, Institute of Microbiology, Department of Biology, ETH Zürich, Switzerland for the kind gift of the YG170 yeast strain, Candice Prevost, Rodolphe Dumontier and Dr Abderrakib Zahid for technical support.

Author Contributions

P.L.; M.B., E.M.R. planned and designed of the research; G.V., P.L.L., J.V., C.P., C.L.B., M.L.W.B., P.C., S.B., performed experiments; G.V., P.L.L., J.V., C.L.B., I.R.J. and V.R. collected and analyzed data, G.V., P.L.L., J.V., M.B., P.L., C.A., E.M.R. interpreted data and A.D., P.L., M.B., E.M.R., G.V., P.L.L., C.L.B. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-10698-z

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

Figures supplémentaires du chapitre I

Heterologous expression of the *N*-acetylglucosaminyltransferase I dictates a reinvestigation of the *N*-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*

Gaëtan Vanier*, Pierre-Louis Lucas*, Corinne Loutelier-Bourhis, Jessica Vanier, Carole Plasson, Marie-Laure Walet-Balieu, Philippe Chan Tchi-Song, Isabelle Remy-Jouet, Vincent Richard, Sophie Bernard, Azeddine Driouich, Carlos Afonso, Patrice Lerouge, Elodie Mathieu-Rivet and Muriel Bardor

* Equal contribution of the first two authors.

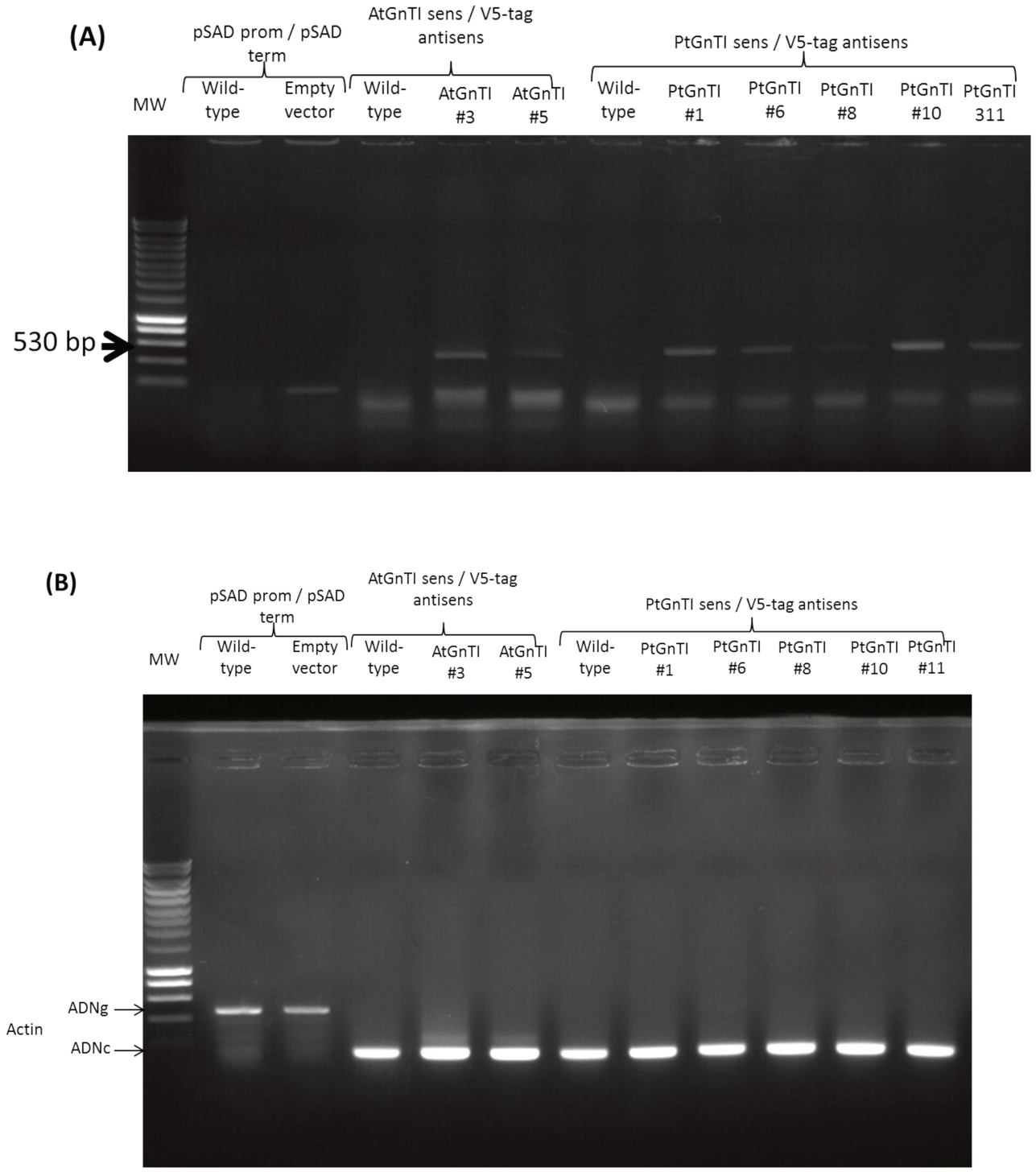


Figure S1 Panel (A) : RT-PCR analysis of AtGnTI (AtGnTI for/V5-tag rev) and PtGnTI (PtGnTI for/ V5-tag rev) transcription level in cw92 strain (WT), cells transformed with the empty vector (EV) and cells transformed with AtGnTI (lines At#3 and At#5) or PtGnTI (lines Pt#1, Pt#6, Pt#8, Pt#10 and Pt#11). Both oligonucleotide couples amplified approximatively a 530 bp fragment. As negative controls, the amplification of the empty cassette (using oligonucleotides pSAD prom / pSAD term specific of the promoter and terminator, respectively) was performed on cDNA from WT and EV (gel lines 1 and 2). The transcription level of transgenes was analyzed relatively to those of the actin gene as a reference: **Panel (B)**, gel lines 3 to 9). The amplification of actin on gDNA from WT and EV (gel lines 1 and 2) revealed a fragment of higher molecular mass, due to the presence of an intron. MW: molecular weight.

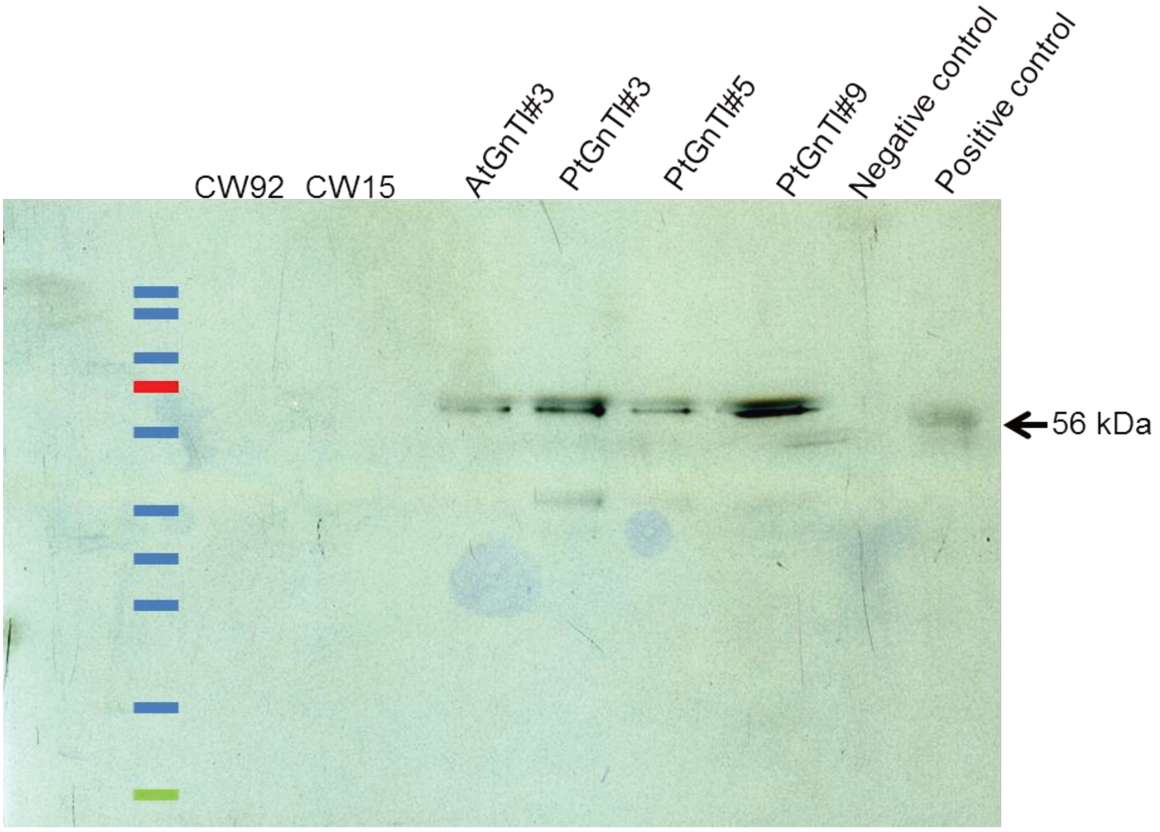


Figure S2: Immunodetection of recombinant GnTI in the microsomal fraction isolated from cw92 cells, cw15 cells and the different lines expressing the AtGnTI and PtGnTI respectively. The immunodetection was performed using an anti-V5 antibody as a primary antibody. A protein extract from CHO cells expressing *PtGnTI-V5* (+) was used as a positive control[19]. MW: molecular weight.

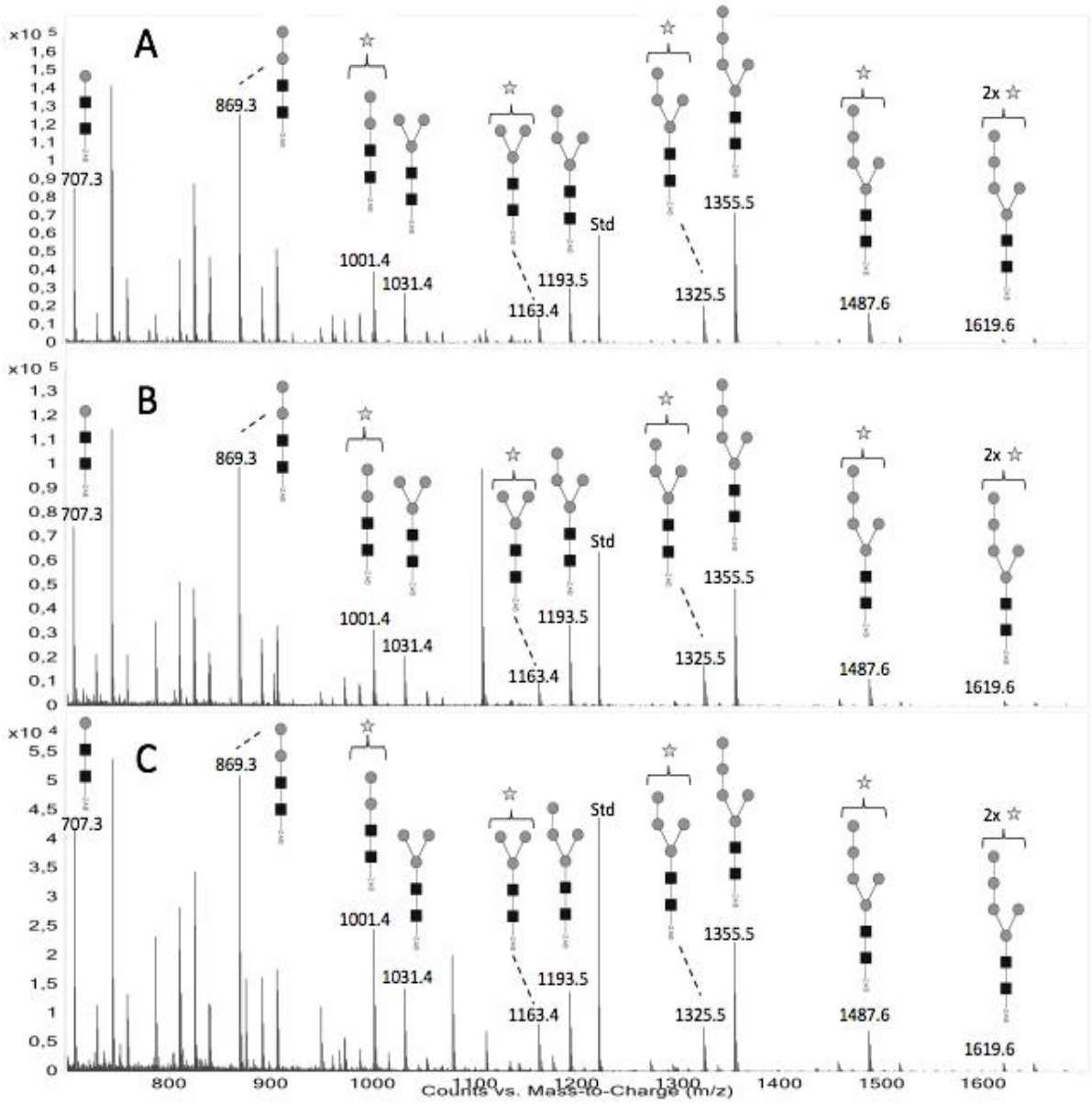


Figure S3. LC-ESI-MS profiles of 2AB derivatives of *N*-glycans isolated from *C. reinhardtii* cw92 cells (a) and transformed lines expressing AtGnTI#3 (b) or PtGnTI#10 lines (c). 2AB: 2-aminobenzamide derivative; Std: internal standard; Black square: GlcNAc; grey circle: Man; star: Xyl.

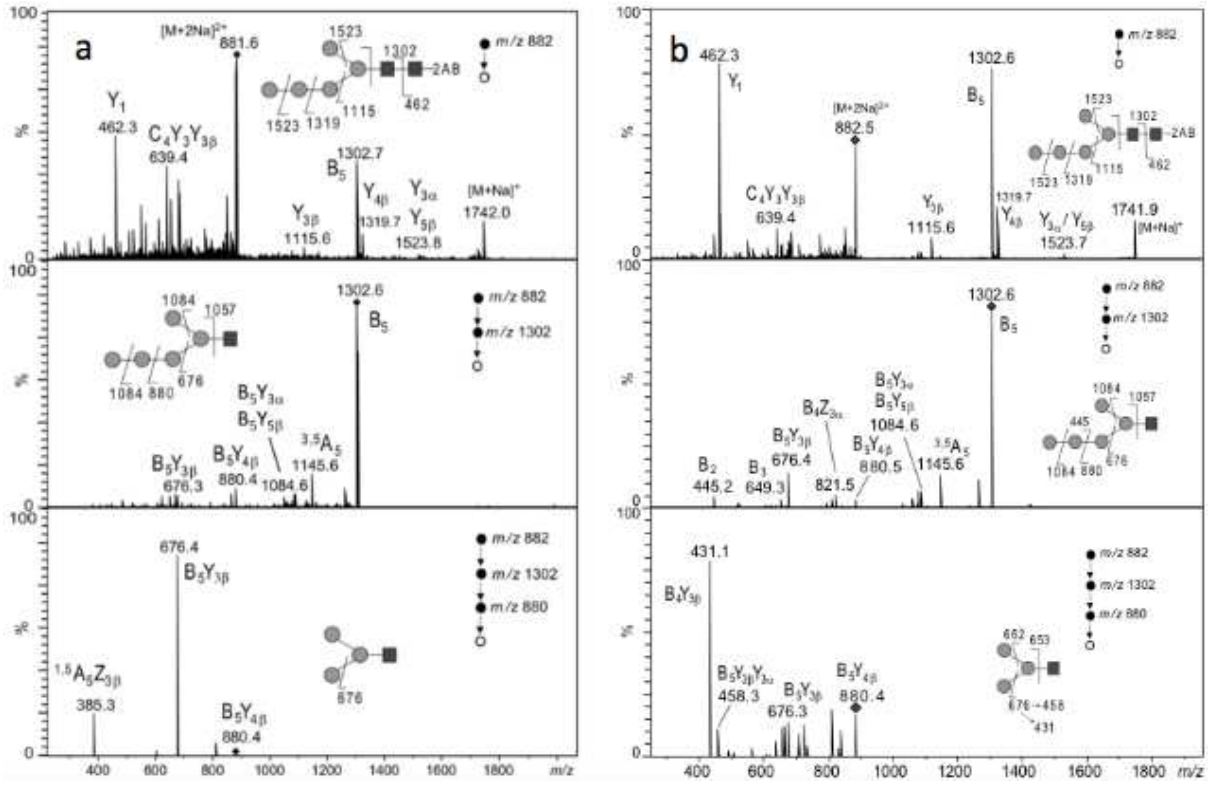


Figure S4. ESI-MS^n spectra with n = 2 (upper panel), n = 3 (middle panel) and n = 4 (lower panel) of permethylated $Man_5GlcNAc_2$-AB derivative (*m/z* 882 corresponding to $[M+2Na]^{2+}$ precursor ion) isolated from (a) cw92 *C. reinhardtii* proteins, (b) AtGnTI *C. reinhardtii* transformant proteins. On each panel, the precursor ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to[28] for a linear $Man_5GlcNAc_2$ structure. 2AB: 2-aminobenzamide derivative; Black square: GlcNAc; grey circle: Man.

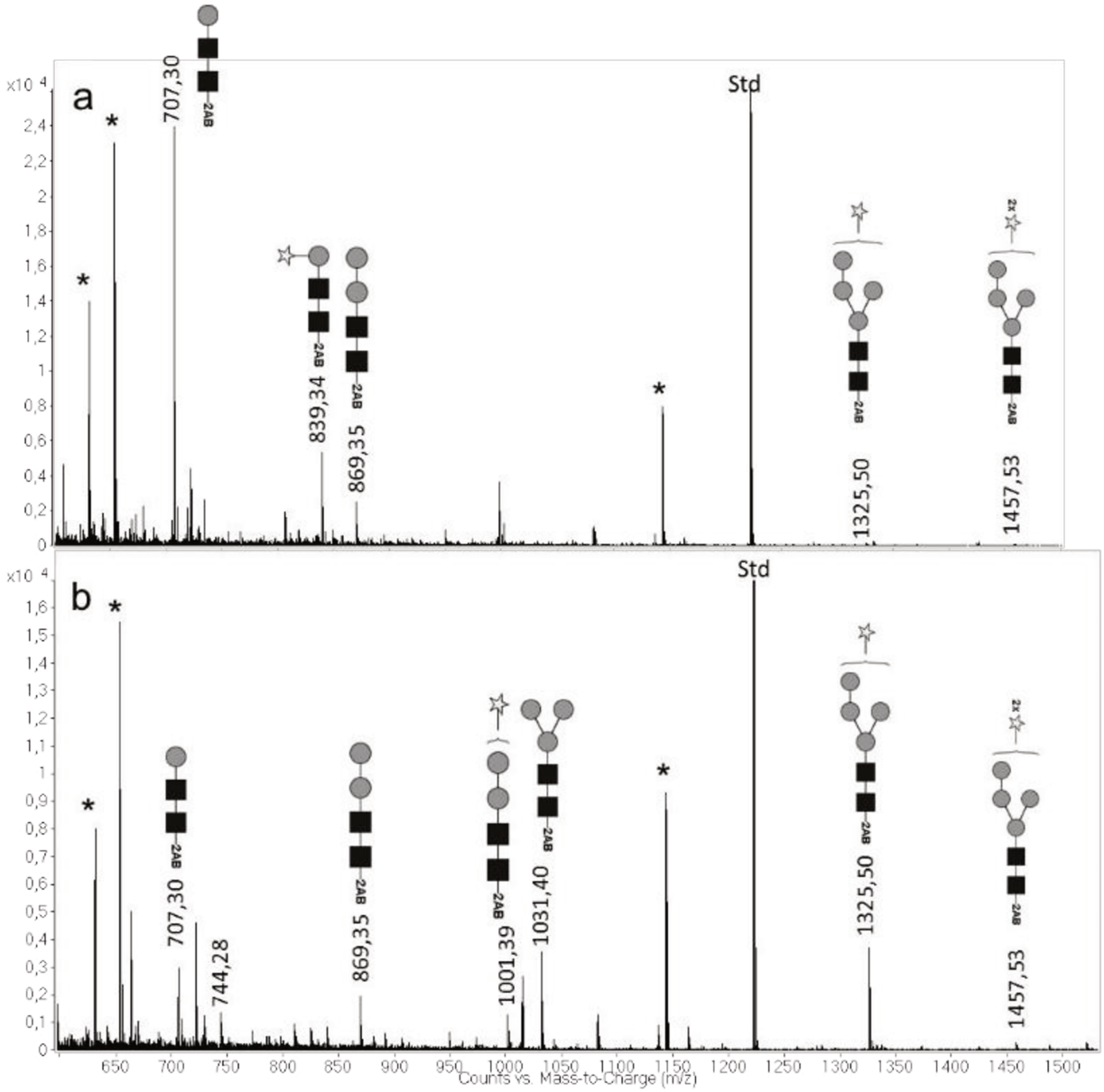


Figure S5. LC-ESI-MS profiles of 2AB derivatives of *N*-glycans isolated from *C. reinhardtii* cw92 cells after treatment with the Jack bean α-mannosidase (a) and the *Aspergillus saitoi* α(1,2)-mannosidase (b). *: contaminants. 2AB: 2-aminobenzamide derivative; Std: internal standard; Black square: GlcNAc; grey circle: Man; star: Xyl.

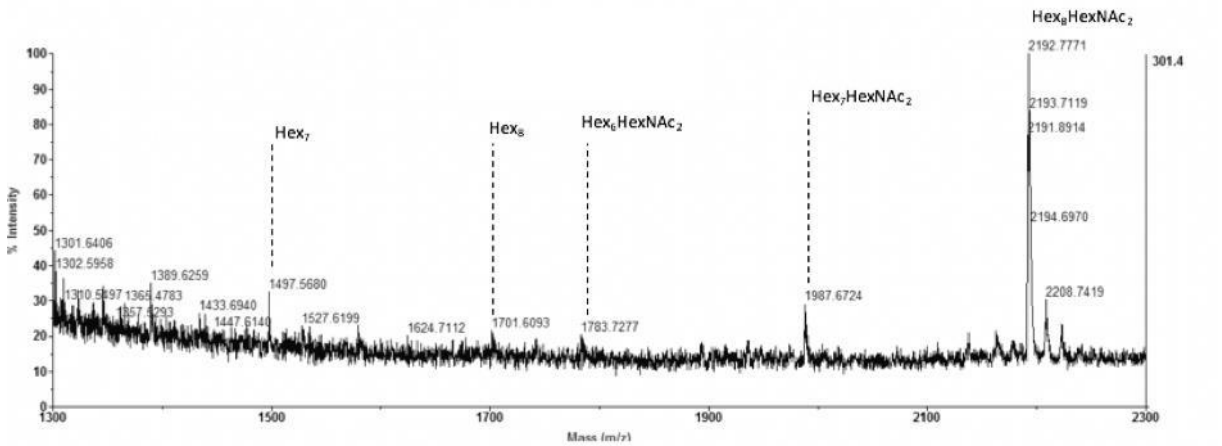


Figure S6. MALDI-TOF-MS profile of permethylated LLO isolated from *C. reinhardtii* cw92 cells.

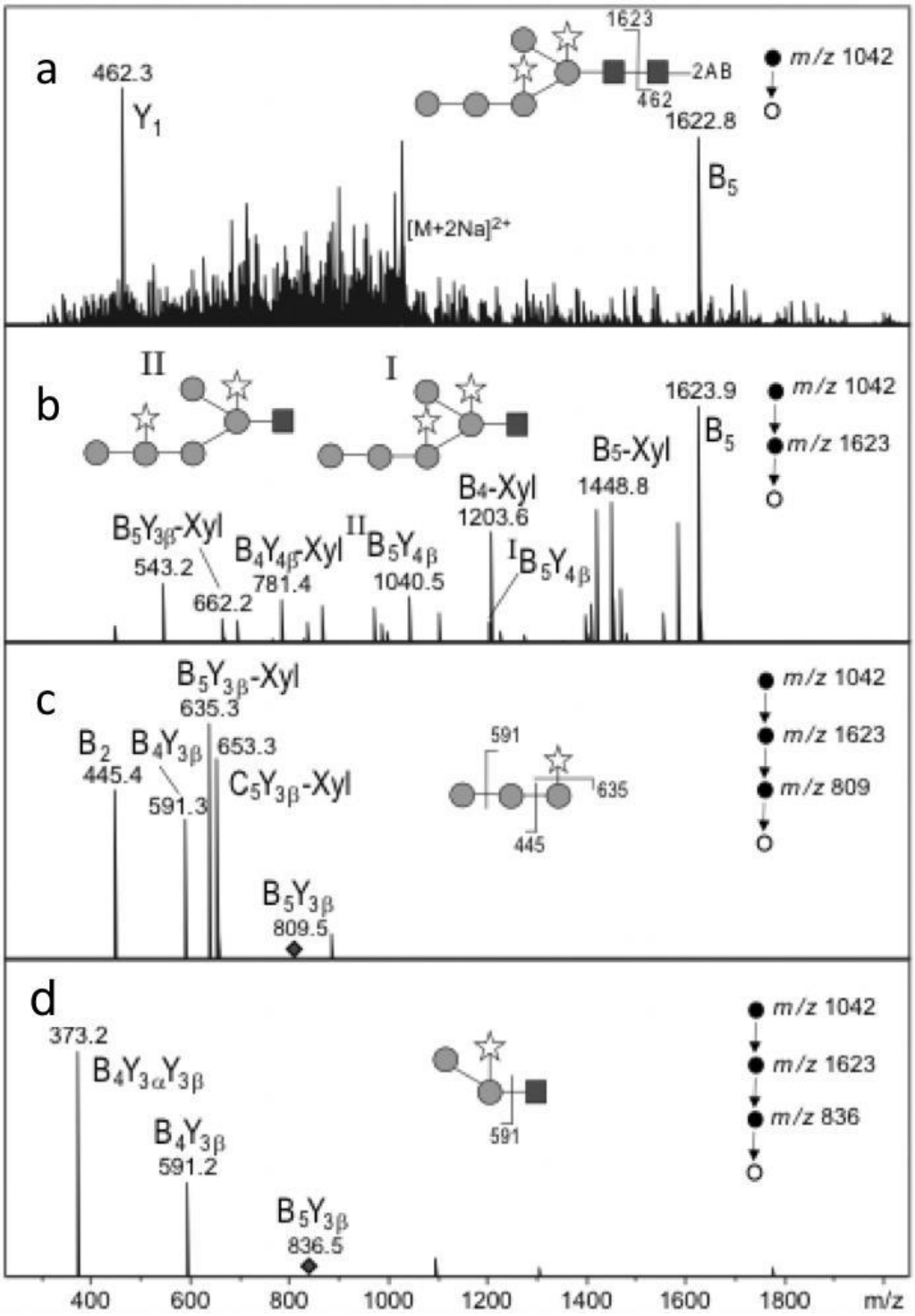


Figure S7. ESI-MS^n spectra with n = 2 (a), n = 3 (b) and n = 4 (c and d) of permethylated $Man_5GlcNAc_2Xyl_2$-2AB derivative (*m/z* 1042 corresponding to $[M+2Na]^{2+}$ precursor ion) isolated from cw92 cells. On each panel, the precursor ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed. 2AB: 2-aminobenzamide derivative; Black square: GlcNAc; grey circle: Man; star: Xyl.

Chapitre II :

Etude des précurseurs oligosaccharidiques liés au dolichol par spectrométrie de masse chez les microalgues, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornutum*.

Chapitre II : Etude des précurseurs oligosaccharidiques liés au dolichol par spectrométrie de masse chez les microalgues, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornutum*.

Ce second chapitre présente un protocole d'extraction des précurseurs oligosaccharidiques liés au dolichol ainsi que leur analyse par spectrométrie de masse validés sur deux microalgues différentes, *C. reinhardtii* (lignée verte) et *P. tricornutum* (Diatomée). Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal à comité de lecture intitulé « Plants Methods » en décembre 2018.

La *N*-glycosylation est un processus présent chez tous les eucaryotes se déroulant en deux étapes. Elle débute par la synthèse d'un précurseur oligosaccharidique sur un lipide ancré dans le réticulum endoplasmique (RE) appelé dolichol. Ce précurseur est ensuite transféré sur une protéine nouvellement synthétisée donnant naissance à une glycoprotéine qui, par la suite, transite dans l'appareil de Golgi où différentes glycosyltransférases modifieront les *N*-glycannes selon les espèces. Alors que les processus enzymatiques de maturation des *N*-glycannes dans l'appareil de Golgi sont bien étudiées, peu d'attention a été portée sur la synthèse du précurseur dans le RE. En effet, comme celle-ci est jugée conservée parmi les organismes eucaryotes avec la synthèse d'un $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, peu d'études ont été menées sur cette partie. Or, des travaux ont mis en avant, notamment chez les parasites, que certaines enzymes, essentielles à la formation du précurseur complet, pouvaient être absentes et ainsi conduire à la synthèse d'un précurseur glycannique diffèrent de celui couramment synthétisé. Les microalgues, comme *C. reinhardtii*, font partie de ces exceptions. En effet, *C. reinhardtii* ne possède pas toutes les ALGs (Asparagin Linked Glycosylation), enzymes nécessaires à la formation du $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ et pourrait synthétiser un précurseur tronqué. Des analyses bio-informatiques menées sur d'autres microalgues comme *P. tricornutum* ont également montrées que certaines ALGs seraient manquantes.

Dans ces travaux, le protocole d'extraction des précurseurs oligosaccharidiques liés au dolichol a été optimisé et appliqué sur la microalgue *P. tricornutum* ainsi que sur des mutants de *C. reinhardtii* affectés dans la partie golgienne des *N*-glycannes. Pour les mutants de *C. reinhardtii*, l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS et par ESI-MS^n (n=4) n'ont pas montré de différence avec les résultats obtenus pour la souche sauvage, confirmant donc, que l'extraction se concentre sur les précurseurs oligosaccharidiques et non sur les glycannes

pris en charge par des enzymes de maturation golgiennes. De plus, ces analyses ont permis de mettre en lumière la structure du précurseur oligosaccharidique de *C. reinhardtii* comme étant une structure de type $Glc_3Man_5GlcNAc_2$, ce qui est en accord avec les analyses bio-informatiques menées préalablement sur le génome.

Pour *P. tricornutum*, les analyses par MALDI-TOF-MS et ESI-MS^n ont pu mettre en avant une structure du précurseur glycannique de type $Glc_2Man_9GlcNAc_2$, soit un glucose de moins que la plupart des eucaryotes confirmant l'absence de l'activité ALG10 décrite précédemment dans Baïet et collaborateurs en 2011. Ces données ont été confirmées par des analyses complémentaires effectuées sur le glycanne golgien de type $Man_5GlcNAc_2$ de cette espèce qui présente une structure tri-antennée comme c'est le cas pour la plupart des eucaryotes.

L'ensemble de ces résultats ont permis de valider un protocole d'extraction suivi d'analyses détaillées par spectrométrie de masse applicable à l'étude chez les microalgues des précurseurs oligosaccharidiques de la *N*-glycosylation.

Lucas *et al. Plant Methods* (2018) 14:107
https://doi.org/10.1186/s13007-018-0374-8

Plant Methods

METHODOLOGY Open Access

User-friendly extraction and multistage tandem mass spectrometry based analysis of lipid-linked oligosaccharides in microalgae

Pierre-Louis Lucas[1†], Rodolphe Dumontier[1†], Corinne Loutelier-Bourhis[2], Alain Mareck[1], Carlos Afonso[2], Patrice Lerouge[1], Narimane Mati-Baouche[1] and Muriel Bardor[1,3*]

Abstract

Background: Protein *N*-glycosylation is initiated within the endoplasmic reticulum through the synthesis of a lipid-linked oligosaccharides (LLO) precursor. This precursor is then transferred *en bloc* on neo-synthesized proteins through the action of the oligosaccharyltransferase giving birth to glycoproteins. The *N*-linked glycans bore by the glycoproteins are then processed into oligomannosides prior to the exit of the glycoproteins from the endoplasmic reticulum and its entrance into the Golgi apparatus. In this compartment, the *N*-linked glycans are further maturated in complex type *N*-glycans. This process has been well studied in a lot of eukaryotes including higher plants. In contrast, little information regarding the LLO precursor and synthesis of *N*-linked glycans is available in microalgae.

Methods: In this report, a user-friendly extraction method combining microsomal enrichment and solvent extractions followed by purification steps is described. This strategy is aiming to extract LLO precursor from microalgae. Then, the oligosaccharide moiety released from the extracted LLO were analyzed by multistage tandem mass spectrometry in two models of microalgae namely the green microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom, *Phaeodactylum tricornutum*.

Results: The validity of the developed method was confirmed by the analysis of the oligosaccharide structures released from the LLO of two xylosyltransferase mutants of *C. reinhardtii* confirming that this green microalga synthesizes a linear $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ identical to the one of the wild-type cells. In contrast, the analysis of the oligosaccharide released from the LLO of the diatom *P. tricornutum* demonstrated for the first time a $Glc_2Man_9GlcNAc_2$ structure.

Conclusion: The method described in this article allows the fast, non-radioactive and reliable multistage tandem mass spectrometry characterization of oligosaccharides released from LLO of microalgae including the ones belonging to the Phaeodactylaceae and Chlorophyceae classes, respectively. The method is fully adaptable for extracting and characterizing the LLO oligosaccharide moiety from microalgae belonging to other phyla.

Keywords: Diatom, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, Lipid-linked oligosaccharides, Microalgae, Multistage tandem mass spectrometry

*Correspondence: muriel.bardor@univ-rouen.fr
†Pierre-Louis Lucas and Rodolphe Dumontier contributed equally to this work
[1] UNIROUEN, Laboratoire Glyco-MEV EA4358, Normandie Univ, 76000 Rouen, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

N-glycosylation is a protein post-translational modification playing many roles in biological process [1]. For example, interactions between host and pathogens or between cells involve specific recognition between oligosaccharides and lectins [1]. Moreover, *N*-glycosylation ensures the conformation, the stability and the biological function of glycoproteins [2]. In plants, *N*-glycosylation has been widely studied, mainly in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana* [3–7]. The *N*-glycan synthesis starts in the endoplasmic reticulum (ER) with a two steps processing involving the action of a set of specific enzymes named Asparagine-Linked Glycosylation (ALG) [8]. The first step, beginning in the cytoplasmic side of the ER, results in the assembly of an oligosaccharide on a lipid carrier called dolichol pyrophosphate (PP-Dol) by successive additions of two *N*-acetylglucosamine and five mannose residues respectively through the action of ALG7, 13, 14, 1, 2 and 11. The lipid-linked oligosaccharide precursor (LLO) is then flipped towards the luminal side of the ER where the ALG3, 9 and 12 add four additional mannose residues, then respective actions of the ALG6, 8 and 10 elongate the LLO structure with three terminal glucose residues [9]. Such assembly of the LLO leads to the $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol precursor in plants which is identical to the structures identified in other eukaryotes [8, 9]. The second step involves the transfer of the oligosaccharide part of the LLO from the PP-Dol to an asparagine residue of a neosynthesized protein by the oligosaccharyltransferase complex (OST) [10, 11]. This is directly followed by the quality control of the protein folding involving, the removal of the three terminal glucose residues as a final step, leading to the formation of oligomannosidic *N*-linked glycans [12, 13]. This nascent folded glycoprotein is then transferred to the Golgi apparatus where *N*-linked glycans will undergo specific maturation by glycosyltransferases and glycosidases which are different among species and lead to different complex-type *N*-glycans. In plants, the *N*-glycosylation maturation process generates complex-type *N*-glycans $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ bearing alpha(1,3)-core fucose and beta(1,2)-core xylose and eventually Lewis a epitopes [7, 14, 15].

So far, little attention has been paid to protein *N*-glycosylation in microalgae. Indeed, all the published work focused on the analysis of the *N*-glycan structures of four main microalgae: *Phaeodactylum tricornutum, Botryococcus braunii, Chlamydomonas reinhardtii and Porphyridium sp.* [16–20]. Major differences in complex *N*-glycan structures of these microalgae were recently reviewed [21]. For example, complex *N*-glycans containing a xylose moiety have been identified in *C. reinhardtii, Porphyridium sp. and Botryococcus braunii* but not in *P. tricornutum*. Currently, no functional study characterizing the enzymes involved in the LLO synthesis in microalgae is available in the literature. Preliminary bioinformatic genome analyses indicated that some ALG could be missing. Indeed, neither ALG3, ALG9 and ALG12 in *C. reinhardtii* nor ALG10 in both *P. tricornutum* and *C. reinhardtii* have been identified so far [16, 18, 22]. Because those genes are crucial for the complete synthesis of the $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ oligosaccharide, the lack of these steps could severely impact the synthesis of the final LLO precursor [9]. To the best of our knowledge, only one publication reported so far the structure of the LLO precursor from *C. reinhardtii* wild-type [23], demonstrating that *C. reinhardtii* accumulates a predominant linear truncated $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ LLO in the ER. Such a truncated structure probably results from the absence of the ALG genes as already described in protozoan parasites. Indeed, parasite LLO extracted from *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii* are characterized by the synthesis of a truncated single arm precursor with five mannose residues and two or three glucose residues [24, 25]. These studies tend to demonstrate that the LLO synthesis is not so well preserved in eukaryotes and deserves to be studied in other species like microalgae. Moreover, information regarding the functional property of LLO in microalgae is currently missing.

In this article, an user-friendly extraction method and multistage tandem mass spectrometry were combined to characterize oligosaccharides released from the LLO of microalgae. This method is elaborated from previous reported works in plants and parasites and has been validated on two xylosyltransferase mutants of the microalga *C. reinhardtii* which were compared to the wild-type cells. The oligosaccharide moiety released from the *C. reinhardtii* mutant LLO was demonstrated to correspond to a linear $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ structure confirming previous results [23]. Then, the protocol has been applied to the Pt1.8.6 strain of the diatom *P. tricornutum* in order to determine the structure of its LLO-released oligosaccharide. Such results demonstrate the adaptability of the method described herein for further studies of LLO extracted from other microalgae.

Results and discussion

Optimization of a protocol for the LLO precursor extraction and characterization in microalgae

Nowadays, most of the protocols reported in the literature for LLO extractions and analyses are based on radioactivity labelling. Cells are incubated with radioactive ^{3}H- or ^{14}C-labelled metabolic precursors which are incorporated into LLO through the cell metabolism [26–28]. This strategy allows detection and analysis of low quantity of LLO but requires specific health and

safety practices and cannot be performed in all laboratories due to the hazard management. Moreover, as incubation times with radioactive precursors are often very short, the incorporated radioactivity may not reflect the complete set of oligosaccharides produced by the organisms and the labelled material represents minute amount which is not compatible with a detailed structural analysis of the radioactive compounds.

Here, we developed a simple protocol for LLO extraction without any radioactive labelling. In this purpose, the LLO were optimally extracted by the combination of two methods previously reported for *T. gondii* and *A. thaliana,* respectively [24, 29]. The first step of the protocol consisted in cell homogenization and a centrifugation step at 10 000xg. The cell homogenization was optimized for *C. reinhardtii* and *P. tricornutum* respectively as their cell wall composition is completely different. The diatom cells containing a more rigid cell wall require more grinding cycles for efficient cell lysis. Therefore, in future application, we would recommend for other microalgae species to apply either the specie-specific cell lysis protocol if available or the one used herein for *P. tricornutum*. It is to note that our extraction procedure does not include lipase inhibitors. However, the PMSF used during the cell lysis step might help decreasing lipase activity as previously described [30, 31]. Therefore in future application, if low LLO-released oligosaccharides are recovered using the protocol described here, it may be worth adding lipase inhibitors before cell breakage to make sure that lipase activities are not degrading the linkage between the dolichol phosphate and the oligosaccharide. Then, the microsomal fraction containing the LLO anchored in the ER were recovered from the other cell components by successive centrifugation steps at 20,000×*g* followed by an ultracentrifugation step at 100,000×*g*. The resulting pellet corresponding to the enriched microsomal fraction was then collected (MP in Fig. 1). The second step corresponds to the LLO purification using successive solvent extraction procedures. Finally, two different methods have been tested in order to hydrolyze the pyrophosphate bond between the lipid and the oligosaccharide of the LLO. The first one consisted in resuspending the LLO in 0.01 M HCl in tetrahydrofuran and incubated the sample at 50 °C for 2 h [24]. The second method involved the hydrolysis of the LLO using 0.1 M of trifluoroacetic acid (TFA) at 80 °C for 1 h [29]. In our hands, only the mild acidic hydrolysis using 0.1 M of TFA gave sufficient amount of LLO-released oligosaccharide for further

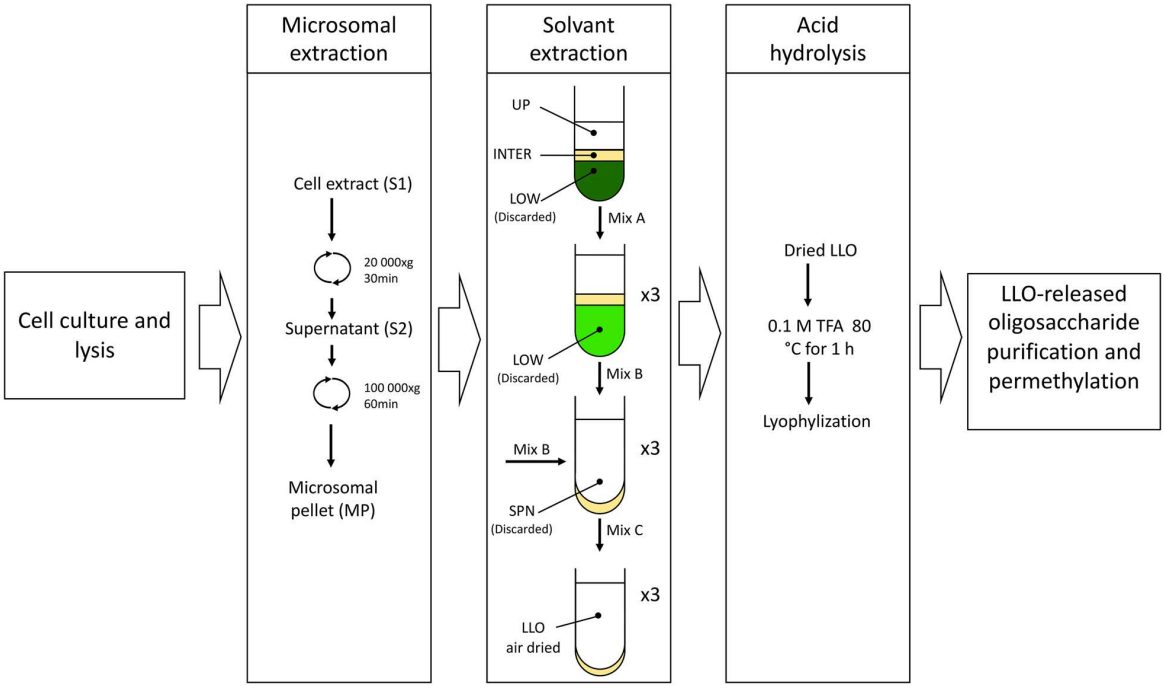


Fig. 1 Scheme summarizing the main steps of the Lipid-Linked Oligosaccharide (LLO) extraction method used in this study to extract and purify the oligosaccharide released from LLO of microalgae. UP: upper phase; INTER: intermediate phase; LOW: lower phase; SPN: supernatant resulting from solvent extraction, Mix: mixture; S: supernatant resulting from centrifugation; MP: microsomal pellet

multistage tandem mass spectrometry analysis. Figure 1 summarizes the overall user-friendly protocol of LLO extraction in microalgae. After purification of the LLO-released oligosaccharide using a Carbograph column, the oligosaccharide was permethylated as previously described [32]. Permethylation of samples presents two main analytical advantages. Firstly, permethylated oligosaccharides are less polar than their native forms and so are more efficiently ionized in MALDI and ESI [33, 34]. Secondly, this greatly facilitates the discrimination between glycan isomers when permethylated oligosaccharides are fragmented by collision-induced dissociation multistage tandem mass spectrometry [35–37].

Identification of oligosaccharide isolated from the LLO of the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*

The optimised protocol was first applied to the characterization of the LLO-released oligosaccharide isolated from the LLO of two *C. reinhardtii* mutants which are impaired in two different genes encoding putative xylosyltransferases (*XTA* and *XTB*) involved in the xylosylation of complex-type *N*-glycans in *C. reinhardtii* [18, 38, 39]. In parallel, wild-type *C. reinhardtii* cells were submitted to the same LLO extraction protocol. After extraction, mild hydrolysis and permethylation, LLO-released oligosaccharides of *XTA, XTB* mutants and wild-type have been analyzed using MALDI-TOF–MS. The resulting mass spectra for all three samples show a predominant ion at *m/z* 2192 which was assigned to be the sodium adduct of a $Hex_8HexNAc_2$ (data not shown). To gain insight into the structural information about this LLO-released oligosaccharide, multistage tandem mass spectrometry (ESI-MS^n) experiments have been performed, as this method has been proven to be powerful to determine the chemical structures of polysaccharide fragments [33, 34, 37] and glycans [23, 40]. Here, the $[M+2Na]^{2+}$ ion (*m/z* 1107.6) of $Hex_8HexNAc_2$ has been selected for fragmentation (Fig. 2). The ESI-MS^n ($n=2$, 3 and 4) spectra show mainly B- and Y-ion series which are fragment ions usually observed in MS/MS analyses of oligosaccharides [23, 37, 41]. They arise from cleavages of the glycosidic bond with loss of either the reducing terminal portion for B-ions or the non-reducing terminal portion for Y-ions. Few BY- ions resulting from two glycosidic cleavages

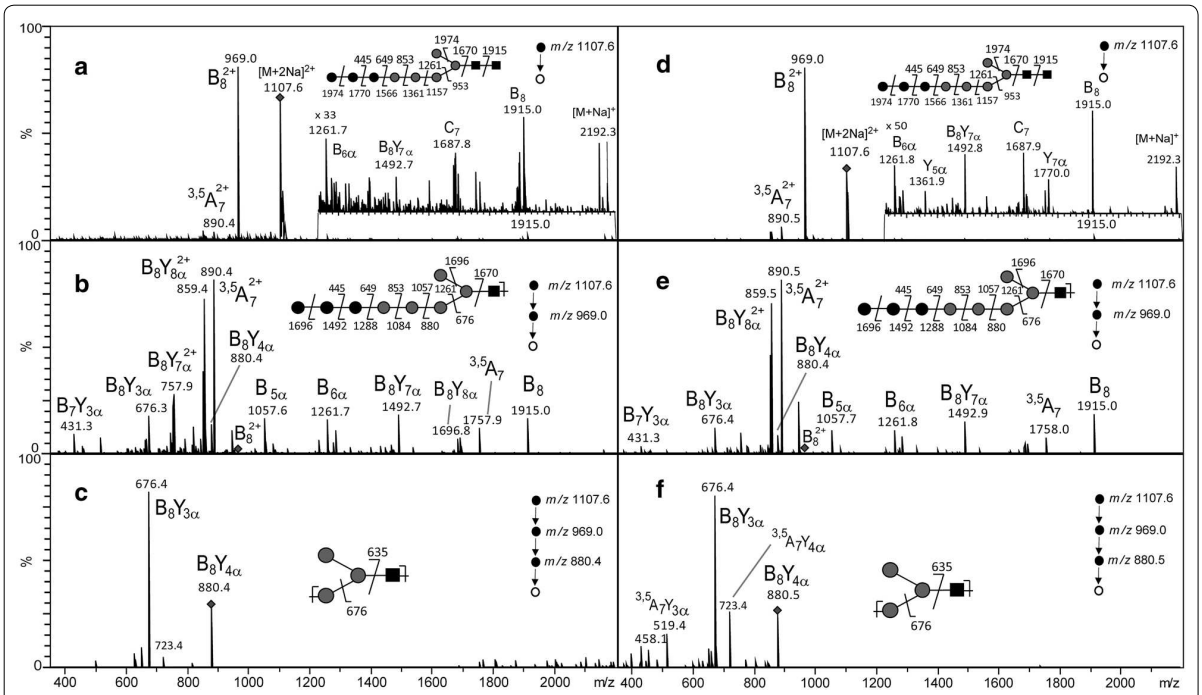


Fig. 2 Multistage tandem mass spectrometry analysis of the permethylated LLO-released oligosaccharide isolated from *C. reinhardtii XTA* mutant (**a**–**c**) and from wild-type (**d**–**f**). ESI-MS^n spectra with n = 2 (**a** and **d**), n = 3 (**b** and **e** and n = 4 (**c** and **f**) of the $[M+2Na]^{2+}$ *m/z* 1107.6 precursor ion of the permethylated $Hex_8HexNAc_2$ derivative isolated from either the *C. reinhardtii XTA* mutant or the wild-type cells. The precursor ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to Prien et al. [40]. Black square: *N*-acetylglucosamine; grey circle: mannose, black circle: glucose. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41]

as well as some A-ions arising from cross ring cleavages were also observed. The fragment ions are labelled according to the nomenclature introduced by Domon and Costello in 1988 [41]. For clarity in the figures, we did not detail all the fragment ions observed on the MS^n spectra, but we choose to focus on those corresponding to diagnostic transitions which allow determining the oligosaccharide structure and even discriminating potential isomers. Thus, the specific fragmentation pathway *m/z* 1107.6 ($[M+2Na]^{2+}$) → *m/z* 969.0 (B_8^{2+}) → *m/z* 880.4 ($B_8Y_{4\alpha}$) → *m/z* 676.4 ($B_8Y_{3\alpha}$) which was observed in both mutants (Fig. 2a–c for *C. reinhardtii XTA* mutant and Additional file 1 for *C. reinhardtii XTB* mutant) as well as in wild-type strains (Fig. 2d–f) is consistent with the oligosaccharide structure previously described for the LLO of the *C. reinhardtii* wild-type cells [23]. Figure 3 shows the fragmentation pattern of the $[M+2Na]^{2+}$ ion (*m/z* 1107.6) with assignments and detailed structures of the diagnostic fragment ions. These results confirmed the presence of a linear LLO structure in *C. reinhardtii XTA* and *XTB* mutants as compared to the wild-type cells. Indeed, as in wild-type, *C. reinhardtii XTA* and *XTB* mutants accumulate a linear LLO-released oligosaccharide containing 8 hexose and 2 *N*-acetylglucosamine residues which largely differs from the $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ synthetized in most of the eukaryotes [9, 11]. The bioinformatic analysis of *C. reinhardtii* genome failed in predicting orthologous genes for ALG3, 9 and 10 responsible for the completion of the LLO synthesis into $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dolichol [18, 22, 38]. Based on these predictions, *C. reinhardtii* LLO-released oligosaccharide structure should be a linear $Glc_2Man_5GlcNAc_2$. However, the MS analysis suggested the accumulation in *C. reinhardtii* of a $Hex_8HexNAc_2$ LLO–released oligosaccharide, thus exhibiting one additional hexose residue than the LLO structure predicted from genomic data. Therefore, a non-yet identified glycosyltransferase should act on the LLO precursor to transfer this additional hexose. As the specific ion transitions *m/z* 1107.6 → *m/z* 969.0 → *m/z* 880.4 → *m/z* 676.4 evidenced by $ESI\text{-}MS^n$ analyses is consistent with the linear glycan structure depicted in Figs. 2 and 3, we proposed that LLO from *C. reinhardtii* mutants exhibit a trihexyl extension which could probably be a triglucosyl one. $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ LLO-released oligosaccharide may result from the action of an additional glucosyltransferase adding a third glucose to the LLO precursor. This hypothesis is further supported by the prediction in the *C. reinhardtii* genome of a putative alpha (1, 2) glucosidase I (GSI) [18, 22, 38]. This enzyme would be responsible for the cleavage of the terminal glucose of the triglucosyl extension on the glycan precursor after its transfer onto the nascent glycoprotein [42, 43].

Identification of the LLO-released oligosaccharide from *Phaeodactylum tricornutum*

To investigate whether the developed method would be suitable for other microalgae species, we investigated the oligosaccharide structure released from the LLO of the diatom *P. tricornutum* which has never been reported so far in the literature. LLO was isolated using the same protocol and its oligosaccharide moiety was cleaved from the dolichol lipid anchor and permethylated prior to MS analysis. MALDI-TOF mass spectrum exhibited two ions at *m/z* 2804 and *m/z* 2820 (data not shown). They respectively correspond to sodium and potassium adducts of a $Hex_{11}HexNAc_2$ structure, differing by one hexose residue from the $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ LLO precursor identified in mammals and land plants [9, 11, 44]. In addition, $ESI\text{-}MS^n$ (n = 1 to 4) analyses have been performed by selecting the $[M+2Na]^{2+}$ of $Hex_{11}HexNAc_2$ structure as a precursor ion (*m/z* 1413.5). $ESI\text{-}MS^n$ (*n* = 3 and 4) experiments (Fig. 4 and Additional files 2, 3 and 4) were performed and were consistent with the tri-antennae structure proposed in Figs. 4a, 5, 6 and Additional file 2. For example, the $ESI\text{-}MS^3$ spectrum selecting *m/z* 1492.7 as the intermediate fragment ion (Figs. 4b, 5) showed the presence of the discriminant fragment ions *m/z* 458.2 ($B_7Y_{3\alpha}Y_{3\beta}$) *m/z* 662.3 ($B_7Y_{4\alpha}Y_{3\beta}$) and *m/z* 866.6 ($B_7Y_{5\alpha}Y_{3\beta}$) of the antennae a in addition to *m/z* 1070.6 ($B_7Y_{6\alpha}Y_{3\beta}$) and *m/z* 1274.7 ($B_7Y_{7\alpha}Y_{3\beta}$) which are not discriminant, because the two latter can arise from the fragmentation of either the antenna **a** or the di-antenna branch **bc**. It is worth noting that *m/z* 1492.7 first fragments into *m/z* 1274.7 by elimination of 218 u (terminal hexose residue). Then, successive losses of 204 u (hexose residue that was linked with two other residues) explain the ion series *m/z* 1070.6, *m/z* 866.6, *m/z* 662.3 and *m/z* 458.2. This fragmentation pattern is characteristic of the antennae a (Fig. 5). The $ESI\text{-}MS^3$ spectrum selecting *m/z* 1682.5 as the intermediate fragment ion (Figs. 4c, 6) revealed the presence of discriminant fragment ions at *m/z* 852.6 and *m/z* 648.4 corresponding respectively to the $Hex_3HexNAc$ and $Hex_2HexNAc$ structures arising from the fragmentation of a branched LLO. It is worth noting that *m/z* 1682.5 can also be assigned to the structure depicted in the Additional file 2 that gives rise to the fragment ions *m/z* 649.3 ($B_{3\alpha}$) and *m/z* 853.6 ($B_{4\alpha}$) in Fig. 4c. The presence of a tri-antenna LLO-released oligosaccharide structure was also evidenced by the $ESI\text{-}MS^4$ spectrum showing the fragmentation pattern "*m/z* 1 413.5 → *m/z* 1 057.6 → *m/z* 839.4 → product ions (Additional file 3). The fragment ions *m/z* 417.2 and *m/z* 621.3 can only result from fragmentation of a branched ion *m/z* 839.4 ($B_{3\beta}Y_{5\beta}$ from antenna bc) while *m/z* 431.2 can only arise from fragmentation of a linear *m/z* 839.4 ($B_{5\alpha}Y_{7\alpha}$) characteristic of antenna a. Moreover, the presence of tri-antenna was also confirmed by complementary $ESI\text{-}MS^n$ experiments

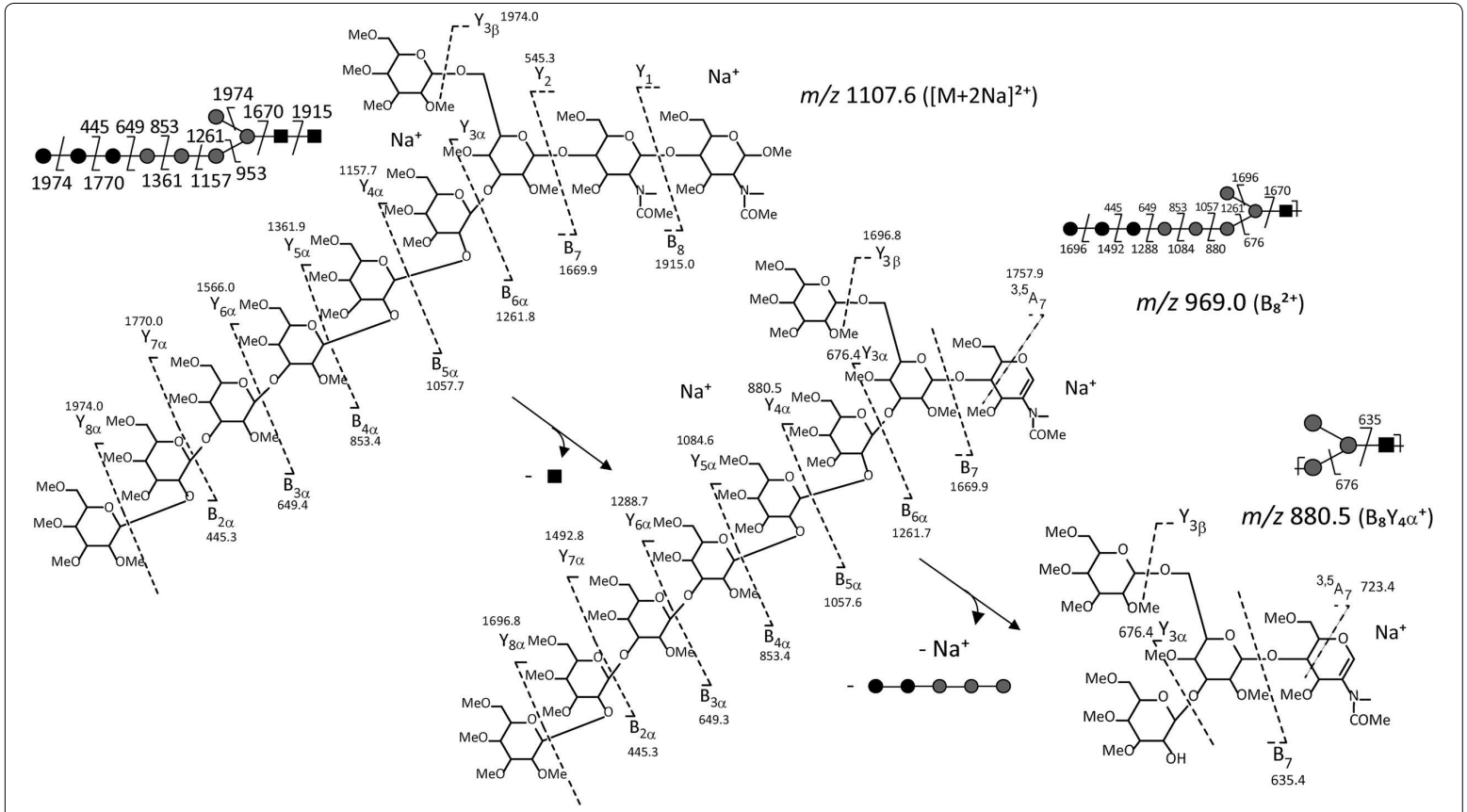


Fig. 3 Scheme representing the fragmentation pattern for *m/z* 1107.6 precursor ion ($[M + 2Na]^{2+}$) of permethylated $Hex_8HexNAc_2$ derivative isolated from the LLO of the *C. reinhardtii XTA* mutant or the wild-type cells. Cleavages of the glycosylic bond and cross ring cleavages are represented by dotted lines. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41]

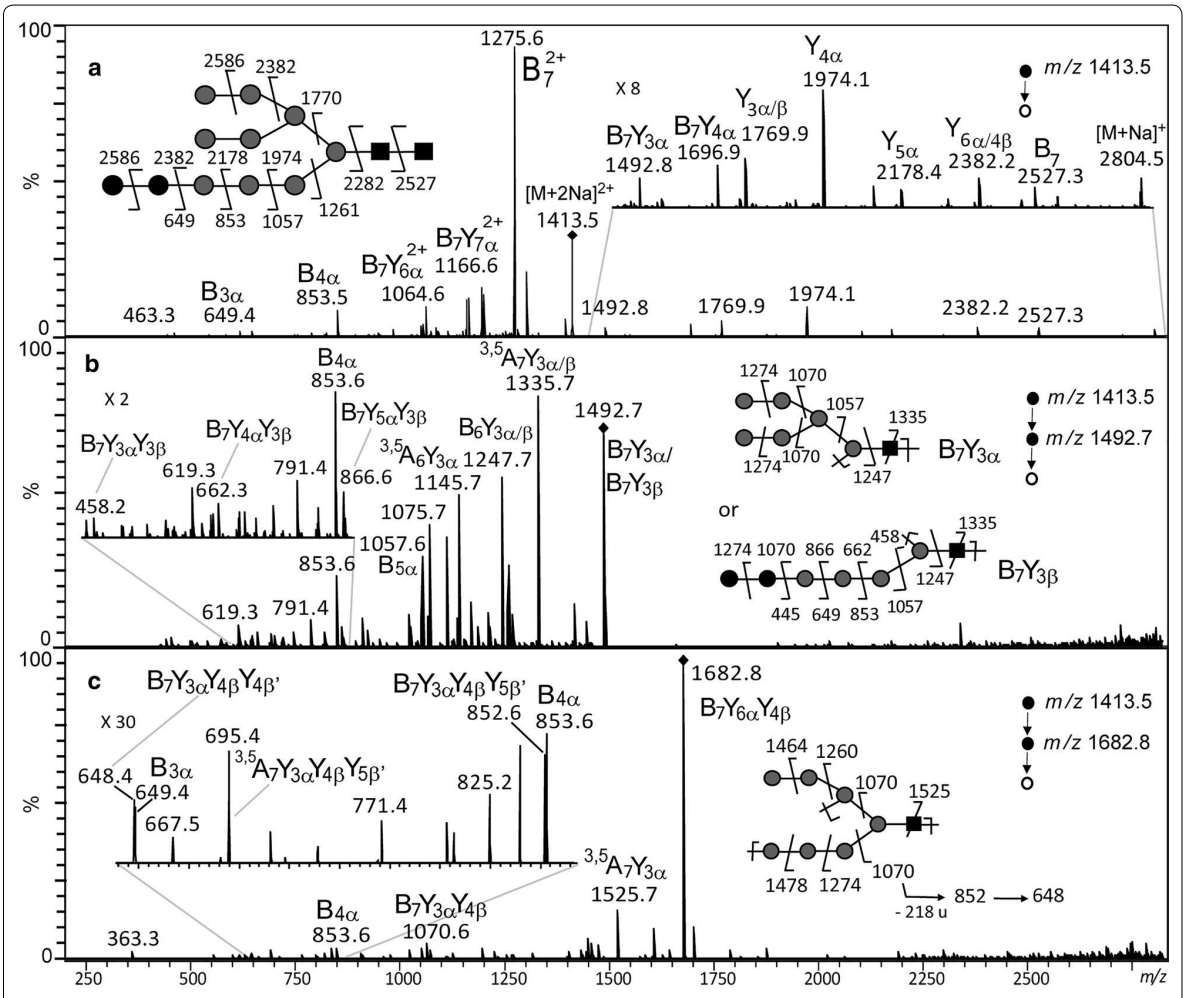


Fig. 4 Multistage tandem mass spectrometry analysis allowing the determination of the structure of the permethylated LLO-released oligosaccharide isolated from the diatom *P. tricornutum*. ESI-MS^n spectra with $n=2$ selecting *m/z* 1413.5 ($[M+2Na]^{2+}$) as the precursor ion (**a**), $n=3$ selecting *m/z* 1492.5 ($[M+Na]^+$) as intermediate ion (**b**) and $n=3$ with *m/z* 1682.5 ($[M+Na]^+$) as intermediate ion (**c**) of permethylated $Hex_{11}HexNAc_2$ derivative) isolated from *P. tricornutum*. On each panel, the ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to Prien et al. [40]. Black square: *N*-acetylglucosamine; grey circle: mannose, black circle: glucose. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41]

(Additional file 4). From these data, two structures, $Glc_3Man_8GlcNAc_2$ or $Glc_2Man_9GlcNAc_2$, can be proposed. The genomic analysis favors the $Glc_2Man_9GlcNAc_2$ for the structure of the oligosaccharide released from the LLO. Indeed, bioinformatics analysis of *P. tricornutum* genome reveals the presence of all the enzymes involved in the synthesis of the precursor, except ALG10 and the GSI which are respectively involved in the addition and removal of the third glucose residue from the LLO precursor [16, 45]. Moreover, previous analysis of the *N*-glycans attached to the endogenous proteins of *P. tricornutum* showed a high abundance of oligomannosidic *N*-glycans especially the one composed of 9 mannose residues [16]. Thus, all together, these results demonstrate that the structure of the oligosaccharide released from the LLO of *P. tricornutum* is a $Glc_2Man_9GlcNAc_2$ structure.

Conclusions

In this communication, we described a simple and user-friendly protocol to extract and analyze the oligosaccharide structure of the LLO from microalgae. This method allows to collect enough material to perform MS detailed

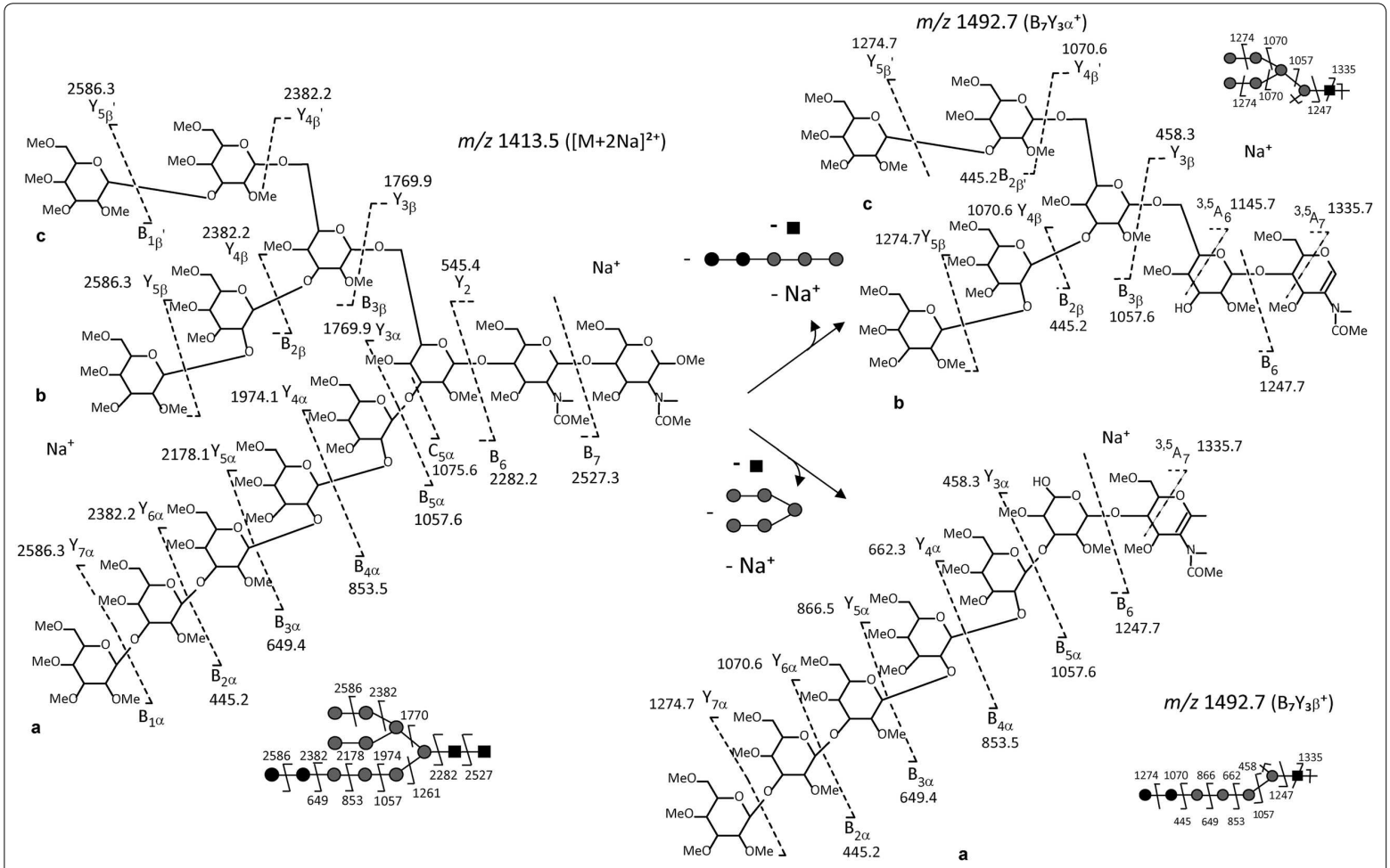


Fig. 5 Scheme representing the fragmentation pattern for *m/z* 1413.5 precursor ion ($[M+2Na]^{2+}$) and *m/z* 1492.7 intermediate ion of permethylated $Hex_{11}HexNAc_2$ isolated from the LLO of *P. tricornutum*. Cleavages of the glycosylic bond and cross ring cleavages are represented by dotted lines. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41]

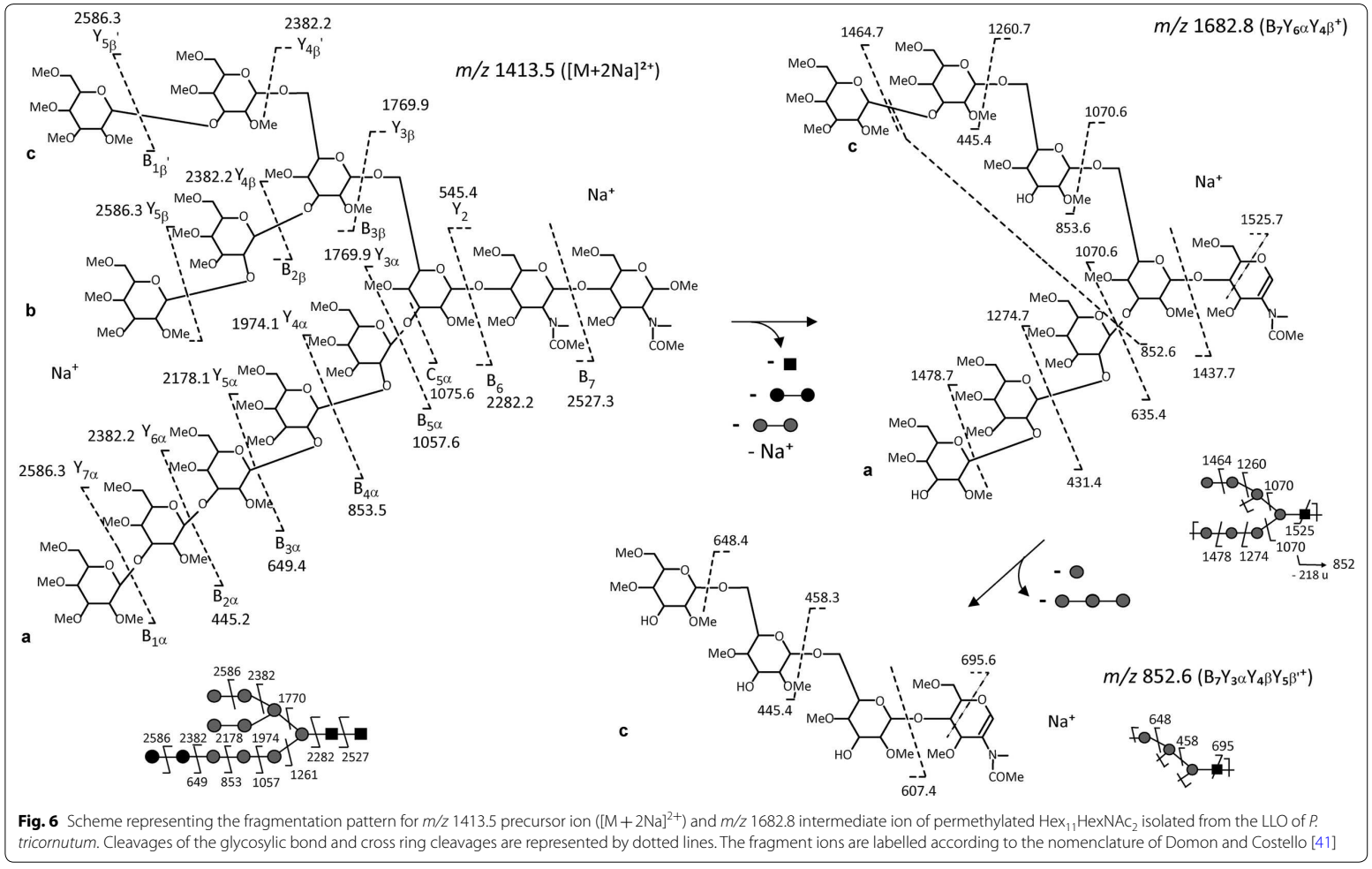


Fig. 6 Scheme representing the fragmentation pattern for *m/z* 1413.5 precursor ion ($[M + 2Na]^{2+}$) and *m/z* 1682.8 intermediate ion of permethylated $Hex_{11}HexNAc_2$ isolated from the LLO of *P. tricornutum*. Cleavages of the glycosylic bond and cross ring cleavages are represented by dotted lines. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41]

analyses, thus representing a powerful approach allowing identification of the structure of the LLO-released oligosaccharide. Moreover, the contribution of multistage tandem mass spectrometry to elucidate chemical structure of complex polymers is once more comforted. The advantage of this technique over radio-labelling methods is the access to the structural identification in close details of either known structures or those to elucidate. The validity of the method has been confirmed by comparison of wild-type and mutant data from *C. reinhardtii* and the elucidation of the LLO-released oligosaccharide structure of *P. tricornutum*. These results illustrate the adaptability of the optimized method as it allows successful identification of the LLO-released oligosaccharide of the diatom, *P. tricornutum* as well as the one from *C. reinhardtii* which belongs to the chlorophyceae lineage. Now, it could be conceived to use this user-friendly method to extract and analyse the LLO-released oligosaccharide structures in other microalgae, allowing understanding of the evolution of the LLO.

Methods

The water used throughout the protocol was deionized water. LC–MS grade water was purchased from ThermoScientific and was used for the purification of the LLO-released oligosaccharide. All the extraction steps up to the mild acidic hydrolysis were performed at 4 °C.

Chlamydomonas reinhardtii cell culture and lysis

The *C. reinhardtii* mutant strains *XTA* (LMJ.RY0402.087519) and *XTB* (LMJ.RY0402.118417) were ordered from the CLIP library (https://www.chlamylibrary.org). Those mutants were generated by random insertion of a paromomycin resistance cassette (CIB1) [46]. Cassette occupancy site in those two mutants had been checked as recommended in [46].

One liter of *C. reinhardtii* cell culture was grown in TAP medium (Tris Acetate Phosphate) at 23 °C, agitated at 150 rpm until reaching an optical density (OD) at 680 nm of 1. A centrifugation at 4500 × *g* using a Beckman Coulter Allegra® X-15R centrifuge with SX4750A rotor for 10 min was then performed in order to pellet the cells. The cells were washed twice with 20 mM phosphate buffer pH 7.4. Then, the cell pellets were resuspended in 6 mL of 20 mM phosphate buffer pH 7.4 containing 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid, 0.5 mM dithiothreitol and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). This solution was prepared extemporaneously. Cells were grinded using glass beads in the Lysing Matrix D tubes (MPbiomedicals) and a homogenizer (Fast Prep-24 5G™ High Speed Homogenizer, MPbiomedicals). Five cycles of 30 s at 6.5 m s^{-1} with chilling for 2 min on ice between each cycle were performed. Samples were then centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min at 4 °C and the supernatant was transferred in ultracentrifugation tubes (Beckman Coulter). Each remaining pellet was resuspended in 1 mL of the same extraction buffer and then, 5 new cycles of 30 s at 6.5 m s^{-1} with chilling for 2 min on ice between cycles were achieved. The resulting supernatants containing the cell lysate (S1) were pooled with the previous ones.

Phaeodactylum tricornutum cell culture and lysis

One liter of Pt 1.8.6 strain (CCAP 1055/1) was grown in sea water (33 g L^{-1} of Instant Ocean Sel Marin, Truffaut) enriched with 0.1% (v/v) of Conway medium and 0.2% (v/v) of 40 g L^{-1} sodium silicate [16] until reaching 1.10^7 cells mL^{-1}. The culture medium was then centrifuged at 4500 × *g* using Beckman Coulter Allegra® X-15R (with SX4750A rotor) for 10 min to pellet the cells. The resulting cell pellets were resuspended as described for *C. reinhardtii* cells. The diatom cells were grinded using a homogenizer (Fast Prep-24 5G™ High Speed Homogenizer, MPbiomedicals) and the Lysing Matrix E tubes (MPbiomedicals) performing 6 cycles of 30 s at 6,5 m s^{-1} with chilling for 2 min on ice between cycles. Samples were then treated as per *C. reinhardtii*. The resulting supernatants contained the diatom cell lysate were named S1.

Microsomal fraction preparation

S1 was centrifuged at 20,000×*g* at 4 °C in a Beckman Coulter ultracentrifuge Optima™ XL-100 K for 30 min using a type 70.1Ti rotor. The resulting pellet was discarded and the supernatant (S2) was centrifuged at 100,000×*g* in the same conditions for 1 h. The new supernatant (S3) was discarded and the resulting pellet containing the microsomal fraction (MP) was conserved for further LLO purification steps.

Solvent extraction

The microsomal fraction was resuspended with 400 µL of water (LC–MS Grade, Fisher Chemical) in a glass tube, 800 µL of methanol (LC–MS Grade, Fisher Chemical) and 1.2 mL of chloroform (ACS reagent grade, Acros Organics) were added (1/2/3, v/v/v). The sample was then homogenized by vortex and centrifuged at 4000×*g* at 4 °C for 2 min in the Beckman Coulter Allegra® X-15R centrifuge using the SX4750A rotor. After centrifugation, the sample exhibited a soluble upper phase (UP), an insoluble lower phase (LOW) separated by an interphase (INTER) (Fig. 1). The lower phase (LOW) containing pigments, was gently discarded using a glass pipette.

Three mL of the mixture A (Mix A in Fig. 1) containing chloroform/methanol and 4 mM $MgCl_2$ in ultrapure water (86/14/1, v/v/v) was then added to the remaining

upper phase. After mixing and centrifugation at 4000×*g* for 2 min at 4 °C, the lower phase was discarded. This step was repeated 3 times to remove all pigments. The remaining upper phase (UP, Fig. 1) was then washed four times with 3 mL of the mixture B (Mix B in Fig. 1) containing methanol/4 mM $MgCl_2$ in water/chloroform (16/15/1, v/v/v). After homogenizing by vortex and centrifuging (4000×*g* at 4 °C for 2 min), the supernatant was discarded. This step was performed 3 times to remove soluble proteins. Finally, the pellet partially air dried, was re-suspended three times with 3 mL of the mixture C (Mix C in Fig. 1) containing chloroform/methanol/water (10/10/3, v/v/v). After homogenization by vortex and centrifugation (4000×*g* at 4 °C for 2 min), the supernatant containing the LLO was transferred in a new glass tube and dried with air stream.

Mild acid treatment

In order to remove the dolichol lipid moiety from the oligosaccharide, dried LLO was hydrolyzed by a mild acid treatment using 0.1 M of TFA (LC–MS grade, Thermo Scientific) at 80 °C for 1 h. In these conditions, the glycosidic bond between the dolichol phosphate and the oligosaccharide was efficiently hydrolyzed. Released oligosaccharides, later called LLO-released oligosaccharide, were then lyophilized.

LLO oligosaccharides purification

LLO-released oligosaccharides were resuspended in 500 µL of water (LC–MS grade, Fisher Chemical) and then purified using carbograph columns (Hypersep™ Hypercarb™ SPE Cartridges, 200 mg, 3 mL, ThermoFisher Scientific). First, the columns were conditioned by successive washing with 3 mL of 1 M sodium hydroxide (Laboratory reagent grade, Fisher scientific), 6 mL of water (LC–MS grade, Fisher Chemical), 3 mL of acetic acid 30% (v/v) Acros Organics) and finally 3 mL of water (LC–MS grade, Fisher Chemical). These steps may be carried out under vacuum (5 mmHg) using a Manifold. Then, the columns were successively washed with 3 mL of 50% acetonitrile in water (v/v) (LC–MS grade, Fisher Chemical), 6 mL of 5% acetonitrile in water (v/v) and finally with 6 mL of water (LC–MS grade, Fisher Chemical). The LLO-released oligosaccharide samples were resuspended in 500 µL of water (LC–MS grade, Fisher Chemical) and were loaded into the column. After washing with 3 mL of water and 3 mL of 5% acetonitrile in water (v/v), LLO-released oligosaccharides were eluted by 4 × 0.5 mL of 50% acetonitrile in 0.1 M of TFA (v/v). The eluted fractions were recovered and were lyophilized in glass tubes prior to permethylation.

Permethylation

A suspension of sodium hydroxide in dimethylsulfoxyde was prepared by grinding about 0.90 g of dried sodium hydroxide (4 tablets) in 3 mL of dimethylsulfoxyde (Sigma-Aldrich). 0.6 mL of this preparation was added to the lyophilized sample. Then, 0.5 mL of iodomethane (ACS reagent grade, Acros Organics) was added and the sample was incubated under agitation for 1 h. One mL of water was added to quench the reaction. One mL of chloroform and 3 mL of water (LC–MS grade, Thermo Scientific) were then added to the samples and mixed. When two phases appeared clearly, the upper aqueous phase was discarded, and 3 mL of water were added. This step was repeated until pH was neutralized. The chloroform phase containing permethylated glycans was then dried.

Permethylated LLO oligosaccharides purification

After permethylation, the LLO-released oligosaccharide was purified using C18 columns (Hypersep™ C18 Cartridges, 200 mg, 3 mL, Thermo Fisher). Columns were conditioned by successive washing with 5 mL of methanol, 5 mL of water (LC–MS grade, Fisher Chemical), 5 mL of acetonitrile and finally with 5 mL of water (LC–MS grade, Fisher Chemical). Permethylated sample was resuspended in 200 µL of 80% methanol (v/v) and were loaded on the column. Successive elutions with 2 mL of 15% (v/v), 35% (v/v) and 75% acetonitrile (v/v) were performed. Permethylated oligosaccharides were recovered in the 75% acetonitrile fraction. The resulting samples were then dried in a Thermofisher SPD111 V SpeedVac®. After drying, the samples were ready to be analyzed using the Matrix Assisted Laser Desorption Ionization—Time Of Flight Mass Spectrometry and ElectroSpray Ionization Multistage tandem Mass Spectrometry (ESI-MS^n).

Matrix assisted laser desorption ionization—mass spectrometry (MALDI-TOF–MS)

MALDI-TOF–MS experiments were performed using an Autoflex III time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics (Bremen, Germany) equipped with a Nd: YAG laser (355-nm wavelength), FlexControl 3.3 and FlexAnalysis 3.3 software package. Spectra were acquired in the positive-ion reflector mode using a mass range *m/z* 500–4000, 100 Hz laser frequency, 10 ns pulsed ion extraction delay and 50% attenuation laser. At least 3 000 individual spectra were averaged. The instrument accelerating voltage was 19 kV. External calibration of MALDI-TOF mass spectra was carried out using singly charged monoisotopic peaks of angiotensin II (5 pmol μL^{-1}), substance P (5 pmol μL^{-1}), ACTH 18–39 fragment (5 pmol μL^{-1}) and insulin B (10 pmol μL^{-1}) in the same experimental (matrix conditions, sample deposit,…) and instrumental

conditions (accelerating voltage, laser frequency, ion extraction delay, attenuation laser,…) than those used for the LLO-released oligosaccharide sample analyses. 2,5-dihydrohybenzoic acid (DHB) was used as matrix: 1 µL of sample was mixed within 1 µL of matrix solution (10 mg mL^{-1} in 0.1% aqueous TFA/acetonitrile (70/30: v/v)), then 0.7 µL of the sample/matrix mixture was spotted and dried onto the MALDI polished stainless-steel target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Electrospray ionization multistage tandem mass spectrometry (ESI-MS^n)

ESI-MS^n ($n=1$ to 4) experiments were performed using a Bruker HCT Ultra ETD II quadrupole ion trap (QIT) mass spectrometer equipped with an electrospray source, the Esquire control 6.2 and Data Analysis 4.0 softwares (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The ESI parameters were as followed: capillary and end plate voltages respectively set at −4.0 kV and −3.5 kV in positive ion mode, skimmer and capillary exit voltages set at 40 V and 120 V, respectively, nebulizer gas (N_2), pressure, drying gas (N_2) flow rate and drying gas temperature were 10 psi, 7.0 L min^{-1} and 300 °C, respectively. The data were acquired using a mass range of either *m/z* 200–2200 range (for $Hex_8HexNAc_2$) or *m/z* 200–2850 range (for $Hex_{11}HexNAc_2$) and using a scan speed of *m/z* 8100 per second. The number of ions entering the trap cell was automatically adjusted by controlling the accumulation time using the ion charge control (ICC) mode (target 100,000) with a maximum accumulation time of 50 ms. The injection low-mass cut-off (LMCO) value was *m/z* 90 (for $Hex_8HexNAc_2$) or *m/z* 140 for $Hex_{11}HexNAc_2$ derivatives. The values of spectra average and rolling average were 6 and 2, respectively. ESI-MS^n experiments were carried out by collision-induced dissociation (CID) using helium as the collision gas, isolation width of 1 or 1.5 *m/z* unit for the precursor ions and for the intermediate ions using a resonant excitation frequency with an amplitude from 0.8 to 1.0 Vp–p. Sample solutions (resuspension in 50 µL of CH_3CN/H_2O were infused into the source at a flow rate of 180 µL h^{-1} by means of a syringe pump (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, USA). External calibration was performed using the 'tuning mix' from Agilent Technologies (Santa Rosa, CA, USA). All mass spectra were manually interpreted, based on literature [23, 40, 41]. The Glycoworkbench software v2.1 was used to support and confirm the assignment of the fragment ions. The ESI-MS^n spectra showed diagnostic fragment ions resulting from the characteristic fragmentation pathways of a specific chemical structure and consequently helped in identifying the oligosaccharide structure according to Prien et al. [40]. The extraction of LLO and MS analyses have been performed at least twice independently.

Additional files

Additional file 1. Multistage tandem mass spectrometry analyses of the structure of the LLO-released oligosaccharide isolated from C. reinhardtii XTB mutant by ESI-MS^n. ESI-MS^n spectra with $n=2$ (panel A), $n=3$ (panel B) and $n=3$ (panel C) of permethylated $Hex_8HexNAc_2$ derivative (*m/z* 1107.6 corresponding to $[M+2Na]^{2+}$ precursor ion) isolated from *C. reinhardtii XTB* mutant. On each panel, the ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to Prien et al. [40]. Black square: *N*-acetylglucosamine; grey circle: mannose, black circle: glucose. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41].

Additional file 2. Scheme representing a fragmentation pathway complementary to the one depicted in Fig. 5. Cleavages of the glycosylic bond and cross ring cleavages are represented by dotted lines. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41].

Additional file 3. Multistage tandem mass spectrometry analyses of the structure of the LLO-released oligosaccharide isolated from *P. tricornutum*. ESI-MS^n spectra with $n=3$ (panel A) and $n=4$ (panel B) of permethylated $Hex_{11}HexNAc_2$ derivative (*m/z* 1413.5 corresponding to $[M+2Na]^{2+}$ precursor ion) isolated from *P. tricornutum*. On each panel, the ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to Prien et al. [40]. Black square: *N*-acetylglucosamine; grey circle: mannose, black circle: glucose. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41]. Note that loss of 204 u correspond to the elimination of a 1,2-; 1,3-; 1,4- or 1,6-linked hexose residue while loss of 218 u correspond to the elimination of a terminal hexose residue. Therefore, the successive losses of two 218 u (*m/z* 1057.5 → *m/z* 839.4 → *m/z* 621.3) indicate a di-antenna ion *m/z* 1057.5 while the successive losses of 204 u (*m/z* 1057.5 → *m/z* 853.4 → *m/z* 649.3) indicate a linear ion *m/z* 1057.5.

Additional file 4. Multistage tandem mass spectrometry analyses of the structure of the LLO-released oligosaccharide isolated from *P. tricornutum*. ESI-MS^n spectra with $n=3$ (panels A, C and E) and $n=4$ (panel B and D) of permethylated $Hex_{11}HexNAc_2$ derivative (*m/z* 1413.5 corresponding to $[M+2Na]^{2+}$ precursor ion) isolated from *P. tricornutum*. On each panel, the ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to Prien et al. [40]. Black square: *N*-acetylglucosamine; grey circle: mannose, black circle: glucose. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41]. Note that loss of 190 u correspond to the elimination of a hexose residue which was linked with three other residues in the oligosaccharide (for example, a 1,3,6-linked hexose residue). Therefore, the successive losses of two 218 u (*m/z* 1247.6 → *m/z* 1029.5 → *m/z* 811.5) indicate a di-antenna ion *m/z* 1247.6 while the loss of 190 u followed by successive losses of 204 u (*m/z* 1247.6 → *m/z* 1057.5 → *m/z* 853.5 → *m/z* 649.4 → *m/z* 445.3) indicate a linear ion *m/z* 1247.6.

Abbreviations

ALG: asparagine-linked glycosylation; ESI: electrospray ionization; Glc: glucose; GlcNAc: *N*-acetylglucosamine; GSI: alpha glucosidase I; Hex: hexose; LLO: lipid-linked oligosaccharide; Man: mannose; MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption ionization—time of flight; MS: mass spectrometry; PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride; PP-Dol: dolichol pyrophosphate; XTA: xylosyltransferase mutant A; XTB: xylosyltransferase mutant B.

Authors' contributions

PLL, MB designed the method; PLL, RD, CLB performed the experiments; PLL, RD, CLB, CA, AM, NMB, PL, MB analyzed the results and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

[1] UNIROUEN, Laboratoire Glyco-MEV EA4358, Normandie Univ, 76000 Rouen, France. [2] UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA, Normandie Univ, 76000 Rouen, France. [3] Institut Universitaire de France (IUF), 75000 Paris, France.

Acknowledgements
Authors would like to thank Dr Elodie Mathieu-Rivet for her help in screening the *C. reinhardtii* mutant clones.

Competing interests
The authors declare to have no competing of interests.

Availability of data and materials
Data and material would be made available upon request.

Consent for publication
All authors have consented for publication.

Ethics approval and consent to participate
Non applicable.

Funding
The authors thank the European Regional Development Fund (ERDF, N°31708), the Region Normandie (Crunch Network, N°20 — 13), the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029), the Institut Universitaire of France (I.U.F.), the University of Rouen Normandie for financial support.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 30 March 2018 Accepted: 23 November 2018
Published online: 05 December 2018

References

1. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology. 1993;3:97–130.
2. Lingg N, Zhang P, Song Z, Bardor M. The sweet tooth of biopharmaceuticals: importance of recombinant protein glycosylation analysis. Biotechnol J. 2012;7:1462–72.
3. Strasser R, Altmann F, Mach L, Glössl J, Steinkellner H. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex *N*-glycans lacking β1,2-linked xylose and core α1,3-linked fucose. FEBS Lett. 2004;561:132–6.
4. Strasser R, Stadlmann J, Schähs M, Stiegler G, Quendler H, Mach L, et al. Generation of glyco-engineered Nicotiana benthamiana for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. Plant Biotechnol J. 2008;6:392–402.
5. Strasser R. Biological significance of complex N-glycans in plants and their impact on plant physiology. Front Plant Sci [Internet]. 2014 [cited 2018 Feb 20];5. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00363/full.
6. Strasser R. Plant protein glycosylation. Glycobiology. 2016;26:926–39.
7. Schoberer J, Strasser R. Plant glyco-biotechnology. Semin Cell Dev Biol [Internet]. 2017 [cited 2018 Feb 16]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952116303603.
8. Schoberer J, Shin Y-J, Vavra U, Veit C, Strasser R. Analysis of protein glycosylation in the ER. Plant endoplasmic reticulum [Internet]. Humana Press, New York, NY; 2018 [cited 2018 Feb 16]. p. 205–22. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7389-7_16.
9. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res. 2013;1833:2430–7.
10. Mohorko E, Glockshuber R, Aebi M. Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. J Inherit Metab Dis. 2011;34:869–78.
11. Breitling J, Aebi M. N-Linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5:a013359–a013359.
12. Määttänen P, Gehring K, Bergeron JJM, Thomas DY. Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. Semin Cell Dev Biol. 2010;21:500–11.
13. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. ER-associated degradation: protein quality control and beyond. J Cell Biol. 2014;204:869–79.
14. Fitchette-Lainé AC, Gomord V, Cabanes M, Michalski JC, Saint Macary M, Foucher B, et al. N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. Plant J Cell Mol Biol. 1997;12:1411–7.
15. Fitchette A-C, Cabanes-Macheteau M, Marvin L, Martin B, Satiat-Jeunemaitre B, Gomord V, et al. Biosynthesis and immunolocalization of lewis a-ContainingN-Glycans in the plant cell. Plant Physiol. 1999;121:333–44.
16. Baïet B, Burel C, Saint-Jean B, Louvet R, Menu-Bouaouiche L, Kiefer-Meyer M-C, et al. N-Glycans of *Phaeodactylum tricornutum* diatom and functional characterization of its N-acetylglucosaminyltransferase I. Enzyme. J Biol Chem. 2011;286:6152–64.
17. Levy-Ontman O, Arad SM, Harvey DJ, Parsons TB, Fairbanks A, Tekoah Y. Unique N-glycan moieties of the 66-kDa cell wall glycoprotein from the red microalga *Porphyridium* sp. J Biol Chem. 2011;286:21340–52.
18. Mathieu-Rivet E, Scholz M, Arias C, Dardelle F, Schulze S, Le Mauff F, et al. Exploring the N-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* unravels novel complex structures. Mol Cell Proteomics MCP. 2013;12:3160–83.
19. Levy-Ontman O, Fisher M, Shotland Y, Weinstein Y, Tekoah Y, Arad SM. Genes involved in the endoplasmic reticulum N-glycosylation pathway of the Red *Microalga porphyridium* sp.: a bioinformatic study. Int J Mol Sci. 2014;15:2305–26.
20. Schulze S, Urzica E, Reijnders MJMF, van de Geest H, Warris S, Bakker LV, et al. Identification of methylated GnTI-dependent N-glycans in *Botryococcus brauni*. New Phytol. 2017;215:1361–9.
21. Dumontier R, Mareck A, Mati-Baouche N, Bardor PL and M. Toward future engineering of the N-glycosylation pathways in microalgae for optimizing the production of biopharmaceuticals. Microalgal Biotechnol [Internet]. 2018 [cited 2018 Sep 3]. https://www.intechopen.com/books/microalgal-biotechnology/toward-future-engineering-of-the-n-glycosylation-pathways-in-microalgae-for-optimizing-the-productio.
22. Mathieu-Rivet E, Kiefer-Meyer M-C, Vanier G, Ovide C, Burel C, Lerouge P, et al. Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals. Front Plant Sci. 2014;5:359.
23. Vanier G, Lucas P-L, Loutelier-Bourhis C, Vanier J, Plasson C, Walet-Balieu M-L, et al. Heterologous expression of the N-acetylglucosaminyltransferase I dictates a reinvestigation of the N-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*. Sci Rep. 2017;7:10156.
24. Garénaux E, Shams-Eldin H, Chirat F, Bieker U, Schmidt J, Michalski J-C, et al. The dual origin of toxoplasma gondii N-glycans. Biochemistry. 2008;47:12270–6.
25. Haserick JR, Leon DR, Samuelson J, Costello CE. Asparagine-linked glycans of *Cryptosporidium parvum* contain a single long arm, are barely processed in the endoplasmic reticulum (ER) or golgi, and show a strong bias for sites with threonine. Mol Cell Proteomics. 2017;16:S42–53.
26. Li E, Tabas I, Kornfeld S. The synthesis of complex-type oligosaccharides. I. Structure of the lipid-linked oligosaccharide precursor of the complex-type oligosaccharides of the vesicular stomatitis virus G protein. J Biol Chem. 1978;253:7762–70.
27. Chapman A, Li E, Kornfeld S. The biosynthesis of the major lipid-linked oligosaccharide of Chinese hamster ovary cells occurs by the ordered addition of mannose residues. J Biol Chem. 1979;254:10243–9.
28. Villers C, Cacan R, Mir AM, Labiau O, Verbert A. Release of oligomannoside-type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins. Biochem J. 1994;298:135–42.
29. Pabst M, Grass J, Toegel S, Liebminger E, Strasser R, Altmann F. Isomeric analysis of oligomannosidic N-glycans and their dolichol-linked precursors. Glycobiology. 2012;22:389–99.
30. Salleh AB, Rahman NZRA, Basri M. New lipases and proteases. New York: Nova Publishers; 2006.
31. Ranjbar M, Zibaee A, Sendi JJ. Purification and characterization of a digestive lipase in the midgut of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Front Life Sci. 2015;8:64–70.
32. Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydr Res. 1984;131:209–17.
33. Kang P, Mechref Y, Novotny MV. High-throughput solid-phase permethylation of glycans prior to mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom RCM. 2008;22:721–34.
34. Mechref Y, Novotny MV. Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity. Chem Rev. 2002;102:321–69.

35. Matamoros Fernández LE, Obel N, Scheller HV, Roepstorff P. Characterization of plant oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry. J Mass Spectrom. 2003;38:427–37.
36. Matamoros LF, Obel N, Scheller HV, Roepstorff P. Differentiation of isomeric oligosaccharide structures by ESI tandem MS and GC-MS. Carbohydr Res. 2004;339:655–64.
37. Plancot B, Vanier G, Maire F, Bardor M, Lerouge P, Farrant JM, et al. Structural characterization of arabinoxylans from two African plant species *Eragrostis nindensis* and Eragrostis tef using various mass spectrometric methods. Rapid Commun Mass Spectrom. 2014;28:908–16.
38. Mathieu-Rivet E, Lerouge P, Bardor M. *Chlamydomonas reinhardtii* : protein glycosylation and production of biopharmaceuticals. Chlamydomonas Biotechnol Biomed [Internet]. Springer, Cham; 2017 [cited 2018 Feb 28]. p. 45–72. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-66360-9_3.
39. Schulze S, Oltmanns A, Machnik N, Liu G, Xu N, Jarmatz N, et al. N-Glycoproteomic characterization of mannosidase and xylotransferase Mutant Strains of Chlamydomonas. Plant Physiol. 2018.
40. Prien JM, Ashline DJ, Lapadula AJ, Zhang H, Reinhold VN. The high mannose glycans from bovine ribonuclease B isomer characterization by ion trap MS. J Am Soc Mass Spectrom. 2009;20:539–56.
41. Domon B, Costello CE. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. Glycoconj J. 1988;5:397–409.
42. Burda P, Aebi M. The ALG10 locus of Saccharomyces cerevisiae encodes the α-1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation. Glycobiology. 1998;8:455–62.
43. Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu Rev Biochem. 2004;73:1019–49.
44. Burda P, Aebi M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochim Biophys Acta BBA. 1999;1426:239–57.
45. Gügi B, Le Costaouec T, Burel C, Lerouge P, Helbert W, Bardor M. Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. Mar Drugs. 2015;13:5993–6018.
46. Zhang R, Patena W, Armbruster U, Gang SS, Blum SR, Jonikas MC. High-throughput genotyping of green algal mutants reveals random distribution of mutagenic insertion sites and endonucleolytic cleavage of transforming DNA. Plant Cell. 2014;26:1398–409.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

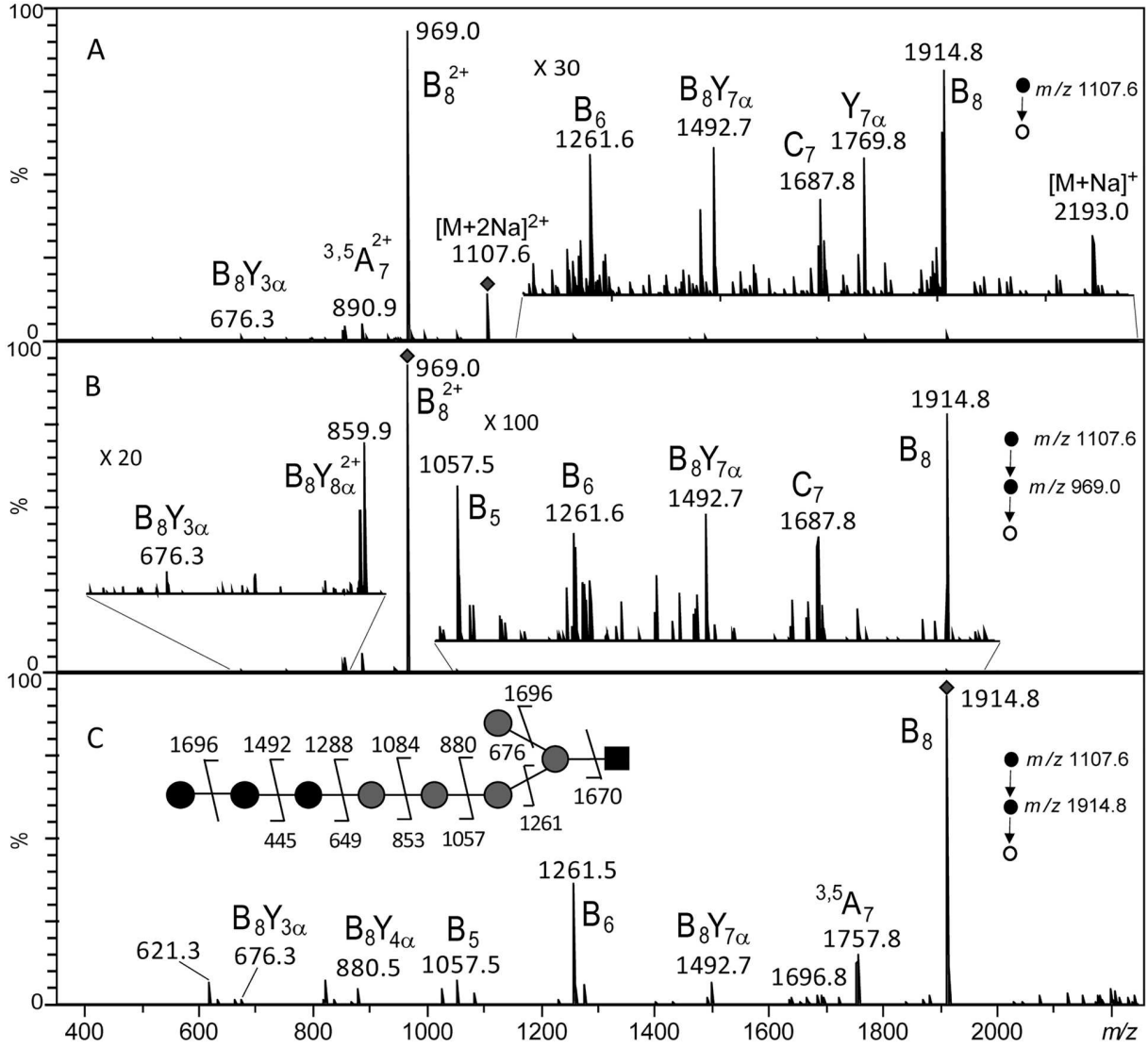
- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

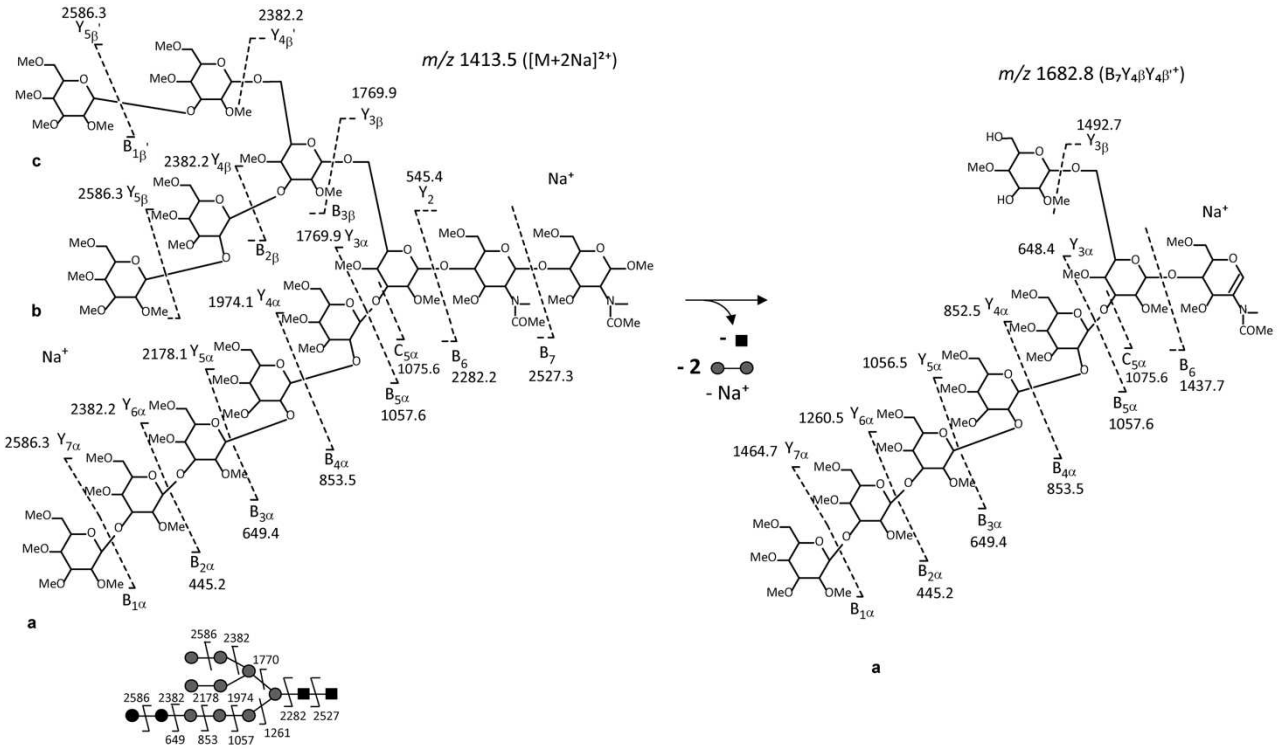
Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC

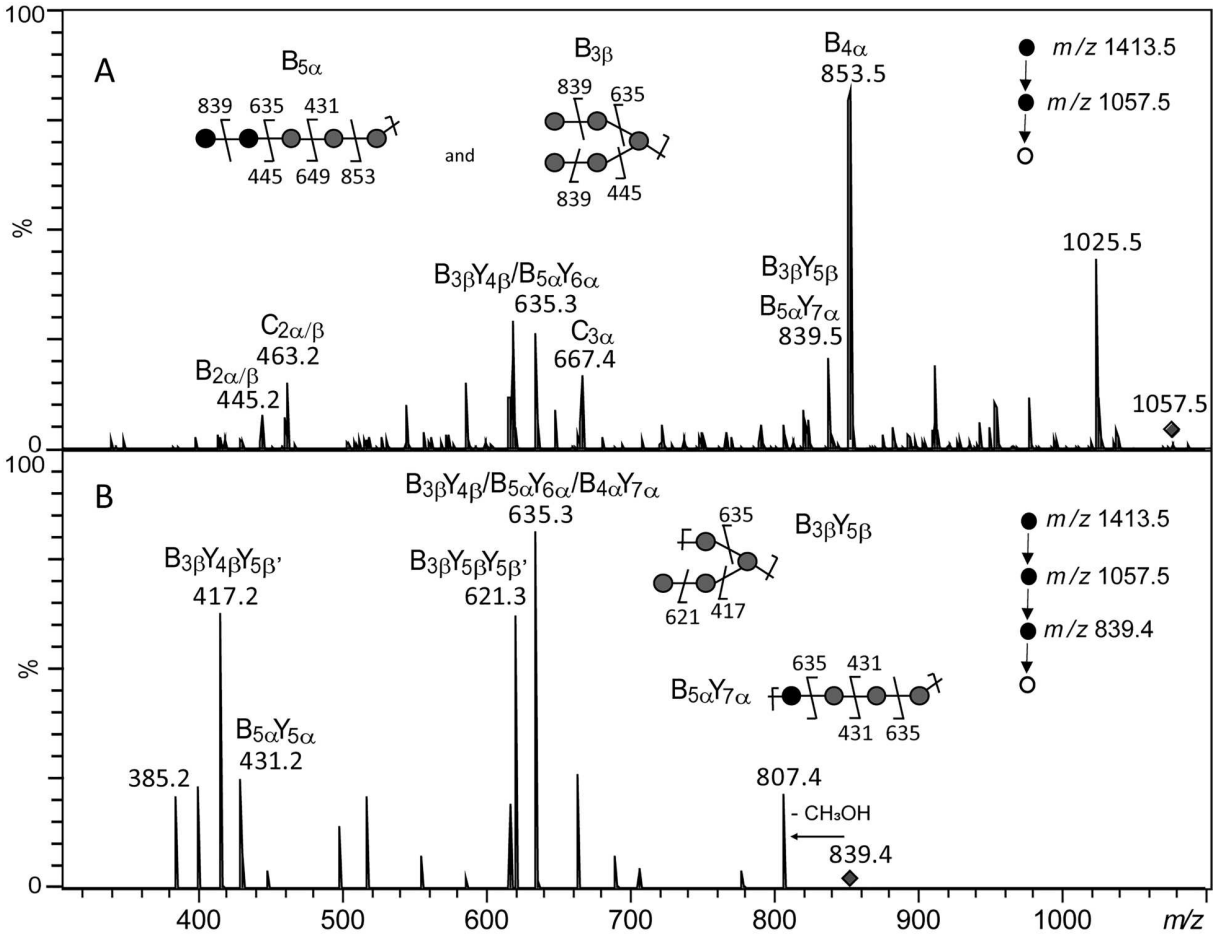
Figures supplémentaires du chapitre II



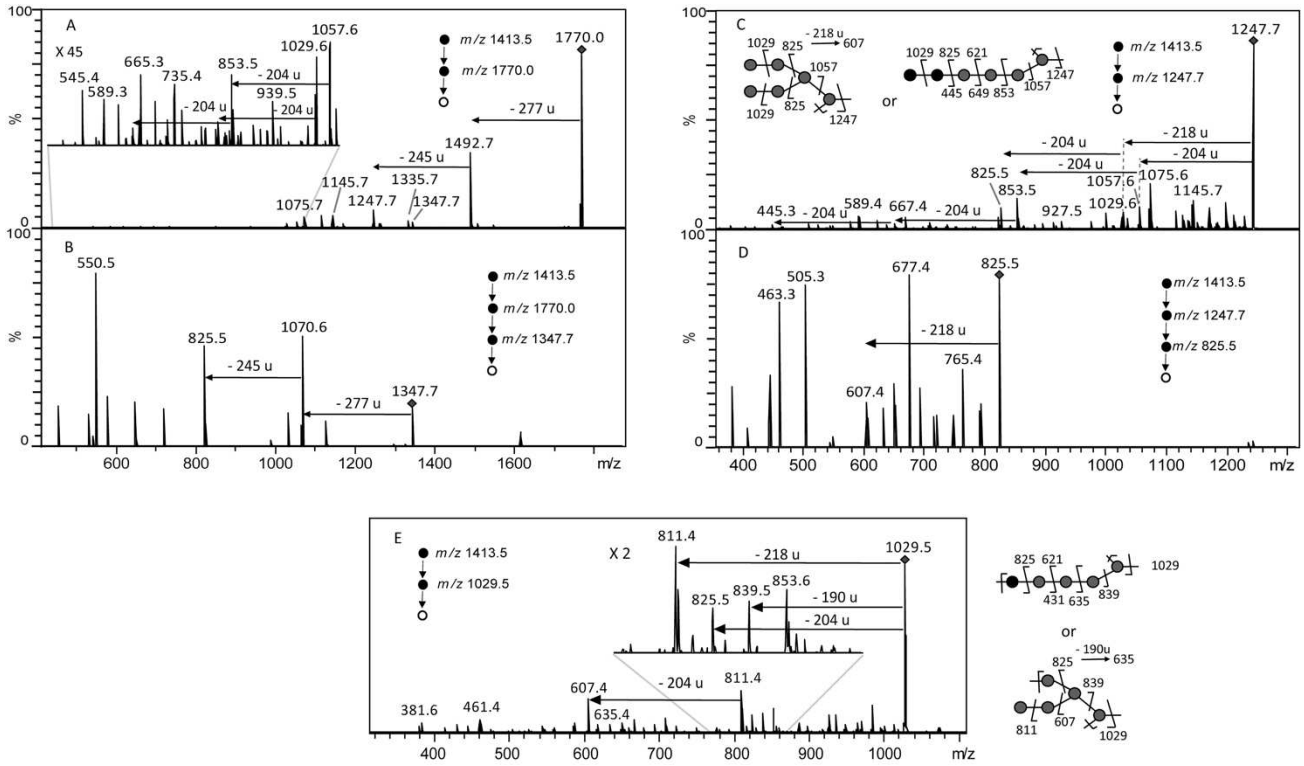
Additional file 1. Multistage tandem mass spectrometry analyses of the structure of the LLO-released oligosaccharide isolated from *C. reinhardtii* XTB mutant by ESI-MSn. ESI-MSn spectra with n = 2 (panel A), n = 3 (panel B) and n = 3 (panel C) of permethylated $Hex_8HexNAc_2$ derivative (m/z 1107.6 corresponding to $[M + 2Na]^{2+}$ precursor ion) isolated from *C. reinhardtii* XTB mutant. On each panel, the ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to Prien et al. [40]. Black square: *N*-acetylglucosamine; grey circle: mannose, black circle: glucose. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41].



Additional file 2. Scheme representing a fragmentation pathway complementary to the one depicted in Fig. 5. Cleavages of the glycosylic bond and cross ring cleavages are represented by dotted lines. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41].



Additional file 3. Multistage tandem mass spectrometry analyses of the structure of the LLO-released oligosaccharide isolated from *P. tricornutum*. ESI-MSn spectra with n = 3 (panel A) and n = 4 (panel B) of permethylated $Hex_{11}HexNAc_2$ derivative (*m/z* 1413.5 corresponding to $[M + 2Na]^{2+}$ precursor ion) isolated from *P. tricornutum*. On each panel, the ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to Prien et al. [40]. Black square: *N*-acetylglucosamine; grey circle: mannose, black circle: glucose. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41]. Note that loss of 204 u correspond to the elimination of a 1,2-; 1,3-; 1,4- or 1,6-linked hexose residue while loss of 218 u correspond to the elimination of a terminal hexose residue. Therefore, the successive losses of two 218 u (*m/z* 1057.5 → *m/z* 839.4 → *m/z* 621.3) indicate a di-antenna ion *m/z* 1057.5 while the successive losses of 204 u (m/z 1057.5 → *m/z* 853.4 → *m/z* 649.3) indicate a linear ion *m/z* 1057.5.



Additional file 4. Multistage tandem mass spectrometry analyses of the structure of the LLO-released oligosaccharide isolated from P. tricornutum. ESI-MSn spectra with n = 3 (panels A, C and E) and n = 4 (panel B and D) of permethylated $Hex_{11}HexNAc_2$ derivative (*m/z* 1413.5 corresponding to $[M + 2Na]^{2+}$ precursor ion) isolated from P. tricornutum. On each panel, the ion selected for the fragmentation analysis is shown with a diamond and its fragmentation pattern is proposed according to Prien et al. [40]. Black square: N-acetylglucosamine; grey circle: mannose, black circle: glucose. The fragment ions are labelled according to the nomenclature of Domon and Costello [41]. Note that loss of 190 u correspond to the elimination of a hexose residue which was linked with three other residues in the oligosaccharide (for example, a 1,3,6-linked hexose residue). Therefore, the successive losses of two 218 u (*m/z* 1247.6 → *m/z* 1029.5 → *m/z* 811.5) indicate a di-antenna ion *m/z* 1247.6 while the loss of 190 u followed by successive losses of 204 u (*m/z* 1247.6 → *m/z* 1057.5 → *m/z* 853.5 → *m/z* 649.4 → *m/z* 445.3) indicate a linear ion *m/z* 1247.6.

Chapitre III :

Caractérisation de la xylosylation des *N*-glycannes chez *Chlamydomonas reinhardtii* par des approches multiples de spectrométrie de masse sur des mutants d'insertion.

Chapitre III : Caractérisation de la xylosylation des *N*-glycannes chez *Chlamydomonas reinhardtii* par des approches multiples de spectrométrie de masse sur des mutants d'insertion.

Ce troisième chapitre présente la caractérisation des structures glycanniques xylosylées présentes chez la microalgue C. *reinhardtii* en combinant différentes analyses de spectrométrie de masse sur des simples et doubles mutants de xylosyltransférases. Ces travaux, présentés sous forme d'article scientifique, ont été soumis pour publication dans le journal à comité de lecture « The Plant Journal » en Mai 2019.

En 2013, Mathieu-Rivet et collaborateurs ont démontré que les *N*-glycannes majoritairement retrouvées chez *C. reinhardtii* étaient des structures oligomannosidiques allant de deux à cinq résidus mannose pouvant également porter un ou deux résidus xylose ainsi que des méthylations. Le 1er résidu xylose a été démontré comme étant un résidu β(1,2)-xylose présent sur le mannose du core glycannique, comme c'est le cas chez les plantes supérieures, tandis que le deuxième résidu xylose a été supposé comme étant lié à l'un des mannoses de la branche α(1,3). Le potentiel immunogène chez l'homme du β(1,2)-xylose des protéines de plantes faisant l'objet de controverse, le retrait de cet épitope et fortement conseillé dans le cadre d'une production de protéines recombinantes injectables. Actuellement, deux xylosyltransférases (XT) putatives, respectivement nommées XTA et XTB, ont été prédites chez *C. reinhardtii* par des analyses bioinformatiques publiées en 2014 par Mathieu-Rivet et collaborateurs. De plus, une étude glycoprotéomique récente menée par Schulze et collaborateurs, en 2018, a montré que la xylosylation du core diminuait fortement en l'absence de XTA. Ces résultats ont également montré que l'ajout de xylose sur le core empêcherait toute dégradation de la chaîne d'α-mannoses par la mannosidase 1A. Dans cette étude, la présence de xylose résiduel sur les glycoprotéines du mutant XTA a été démontré. En conséquence, Schulze et collaborateurs ont proposé que XTB pourrait être responsable de la xylosylation restante.

Dans ce chapitre, l'analyse des *N*-glycannes provenant de mutants d'insertion des XTA et XTB, nommés respectivement IM$_{XTA}$ et IM$_{XTB}$ et du double mutant IM$_{XTA}$xIM$_{XTB}$, a été effectuée par diverses approches de spectrométrie de masse (LC-ESI-MS, ESI-MS^n, IMS-MS^2) et Western Blot, afin de caractériser finement les structures glycanniques xylosylées chez *C. reinhardtii* et de déterminer le rôle potentiel de XTA et XTB dans les processus de xylosylation.

Pour XTA, les résultats obtenus par spectrométrie de masse et par Western Blot, en utilisant un anticorps spécifiquement dirigé contre le β(1,2)-xylose du core glycannique, ont montré que cette xylosyltransférase serait l'enzyme majoritairement responsable du transfert du β(1,2)-xylose sur le mannose du core. Pour XTB, les résultats ont montré que cette xylosyltransférase serait majoritairement responsable du transfert du xylose sur le deuxième mannose de la branche α(1,3). Cependant, comme du β(1,2)-xylose est toujours détectable dans le simple mutant IM_{XTA} et ne l'est plus dans le double mutant IM_{XTA}xIM_{XTB}, nous avons conclu que XTB serait également capable de transférer du β(1,2)-xylose sur le core glycannique, à minima, en absence d'activité XTA. De plus, l'analyse du double mutant IM_{XTA}xIM_{XTB} a mis en évidence la présence résiduelle de xylose sur la branche linéaire du glycanne malgré l'absence de XTA et XTB permettant d'émettre l'hypothèse que d'autres XT seraient impliquées dans la maturation des *N*-glycannes chez *C. reinhardtii*. De nouvelles analyses bioinformatiques menées dans le cadre de ces travaux ont ainsi permis d'identifier trois candidats potentiels pouvant être responsables de cette xylosylation supplémentaire.

Xylosylation of protein *N*-linked glycans in *Chlamydomonas reinhardtii* is heterogeneous and mediated by a multigene xylosyltransferase family.

Pierre-Louis Lucas[1,2,3], Elodie Mathieu-Rivet[1,2,3], Philippe Chan[3,4], Anne Oltmanns[5], Corinne Loutelier-Bourhis[6], Carole Plasson[1,2,3], Carlos Afonso[6], Michael Hippler[5], Patrice Lerouge[1,2,3], Narimane Mati-Baouche[1,2,3], Muriel Bardor*[1,2,3,7]

1. Normandie Univ, UNIROUEN, Laboratoire Glyco-MEV EA4358, 76000 Rouen, France.
2. Normandie Univ, UNIROUEN, SFR NORVEGE, Rouen, France
3. Normandie Univ, UNIROUEN, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France.
4. Normandie Univ, UNIROUEN, Plate-Forme de Protéomique PISSARO, 76000 Rouen, France.
5. Institute of Plant Biology and Biotechnology, University of Münster, 48143 Münster Germany,
6. Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA, 76000 Rouen, France,
7. Institut Universitaire de France (IUF), 75000 Paris, France.

*Corresponding author: Muriel Bardor – muriel.bardor@univ-rouen.fr; Tel: +33 2 35 14 67 51

Author to whom proofs and reprints should be addressed: Muriel Bardor – muriel.bardor@univ-rouen.fr; Tel: +33 2 35 14 67 51

Running title: Xylosylated *N*-glycans in *C. reinhardtii*.

Supporting Information is included as a single pdf file. The file includes two Tables (Supporting Tables S1 and S2) and 6 Figures (Figures S1 to S6).

SUMMARY

Nowadays, few information is available regarding the *N*-glycosylation pathway in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii.* Recent investigation demonstrated that *C. reinhardtii* synthesizes linear oligomanosides. Maturation of these oligomannosides results in *N*-glycans that are partially methylated and carrying one or two xylose residues. One xylose residue was demonstrated to be a core β(1,2)-xylose. Recently, *N*-glycoproteomic analysis performed on glycoproteins secreted by *C. reinhardtii* demonstrated that the xylosyltransferase A (XTA) is responsible for the addition of the core β(1,2)-xylose. Furthermore, another xylosyltransferase candidate named XTB was suggested to be involved in the xylosylation in *C. reinhardtii*. In the present study, we focus especially on the characterization of the structures of the xylosylated *N*-glycans from *C. reinhardtii* taking advantages of insertional mutants of XTA and XTB and of the XTA/XTB double mutant. The combination of mass spectrometry approaches allowed us to identify the major *N*-glycan structures bearing one or two xylose residues. They confirm that XTA is responsible for the addition of the core β(1,2)-xylose whereas XTB is involved in the addition of the xylose residue onto the linear branch of the *N*-glycan as well as in the partial addition of the core β(1,2)-xylose suggesting that this transferase exhibits a low substrate specificity. Analysis of the double mutant suggests that an additional xylosyltransferase is involved in the xylosylation process in *C. reinhardtii*. New putative candidates have been identified in the *C. reinhardtii* genome. Altogether, these results pave the way for a better understanding of *C. reinhardtii N*-glycosylation pathway.

Key words: *N*-glycosylation/ xylosylation/ xylosyltransferases/ *Chlamydomonas reinhardtii/* insertional mutants/ Ion Mobility /-Mass spectrometry.

Significance statement: Xylosylation in *C. reinhardtii* leads to heterogeneous *N*-glycan structures. XTA is responsible for the addition of core β(1,2)-xylose whereas XTB could be

involved in the addition of xylose residue onto the linear branch of the *N*-glycan and in complement to XTA, in the partial addition of the core β(1,2)-xylose, suggesting that this transferase exhibits a low acceptor substrate specificity.

INTRODUCTION

N-glycosylation is one of the most important co- and post-translational modifications of proteins in eukaryotes. This modification starts in the endoplasmic reticulum (ER) by the synthesis of an oligosaccharide precursor attached to a lipid anchor (dolichol pyrophosphate, PP-Dol), through the action of enzymes called ALGs (Asparagine Linked Glycosylation) (Aebi, 2013). Firstly, they catalyze the transfer of two *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and five mannose (Man) residues giving rise to a $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol structure on the cytosolic face of the ER. The resulting $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol is then flipped through the ER membrane, where, now facing the ER lumen, the synthesis of $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol is completed by the respective action of the ER-resident ALG3; ALG9; ALG12; ALG6; ALG8 and ALG10 (Aebi, 2013). This precursor is finally transferred by the oligosaccharyltransferase complex onto Asn-X-Ser/Thr/Cys *N*-glycosylation consensus sites of the nascent proteins (Stanley et al., 2015). After the removal of the three terminal glucose residues during the ER-quality control, the glycoprotein is transferred into the Golgi apparatus where specific glycosidases and glycosyltransferases catalyze the processing of *N*-linked oligomannosides into complex-type *N*-glycans. Since Golgi enzyme repertoires differ between eukaryotes, complex-type *N*-glycans exhibit a large diversity of structures depending on cells and organisms (Varki, 2017; Wang et al., 2017). For example, mammalian glycoproteins are bearing bi-, tri- and tetra-antennary *N*-glycans which are galactosylated and covered by terminal sialic acids whereas plant *N*-glycans are bearing β(1,2)-core xylose, α(1,3)-core fucose and eventually Lewis^a terminal antennae (Lerouge et al., 1998; Strasser, 2016).

With regards to microalgae, studies have demonstrated that the Golgi maturation of *N*-glycans in microalgae like *Volvox carteri*, *Porphiridium sp.*, *Phaeodactylum tricornutum*,

Botryococcus braunii, Euglena gracilius, Chlorella vulgaris, also give rise to a large variety of oligosaccharides ranging from oligomannosidic to complex-type *N*-glycans decorating with *N*-acetylglucosamine, xylose, fucose, aminoethylphosphonate moiety and/or *O*-methylated mannose residues (Balshüsemann and Jaenicke, 1990; Levy-Ontman et al., 2011; Baïet et al., 2011; Levy-Ontman et al., 2014; Schulze et al., 2017; O'Neill et al., 2017; Mócsai et al., 2019). Among microalgae, *C. reinhardtii* is the best studied so far as it has been chosen as a model laboratory system for many biological processes ranging from photosynthesis over flagellar movement including acclimation to nutrient deficiency (Rochaix, 2002; Merchant et al., 2007; Marshall, 2008; Harris, 2009). Recent investigation of the lipid-linked precursor biosynthesis demonstrated that *C. reinhardtii* lacks ER resident enzymes ALG3, ALG9 and ALG12 and, therefore, synthesizes a pentamannosylated linear $Glc_3Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol precursor (Lucas et al., 2018). This truncated precursor is transferred onto the nascent proteins through the action of the predicted OST complex (Mathieu-Rivet et al., 2017). Then, the glucose residues are removed to form a linear $Man_5GlcNAc_2$ instead of the branched $Man_5GlcNAc_2$ usually found in eukaryotes (Vanier et al., 2017). In *C. reinhardtii*, the maturation of this linear oligomannoside in the Golgi apparatus occurs *via* a *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnT I) independent pathway and results in glycans *N*-linked to proteins ranging from $Man_5GlcNAc_2$ to $Man_3GlcNAc_2$ which are partially methylated and carry one or two xylose residues (Mathieu-Rivet et al., 2013, 2014). One xylose residue was demonstrated to be linked in β(1,2) to the core of the *N*-glycans as described in plants and *Helix pomatia N*-glycans (Lerouge et al., 1998; Bardor et al., 2003). The second xylose residue is likely linked to one of the α-mannose residues of the α(1,3)-branch of the $Man_5GlcNAc_2$ oligomannoside (Vanier et al., 2017). *In silico* analyses of the *C. reinhardtii* genome revealed a gene encoding a putative xylosyltransferase (XTA, Cre09.g391282) (Mathieu-Rivet et al., 2013, 2014). Recent glycoproteomic analyses performed on *N*-glycoproteins secreted by *C. reinhardtii* have shown that the knock-out of this xylosyltransferase resulted in a decrease in the core *N*-glycan xylosylation of extracellular glycoproteins (Schulze et al., 2018). Moreover, the core

xylosylation seemed to be involved in the regulation of *N*-glycan trimming performed in a Man1A dependent manner. Additionally, a double mutant of Man1A and XTA was presented in this study, which showed core xylose residues despite the knock-out of XTA. Therefore, the presence of an additional xylosyltransferase (XTB, Cre16.g678997) was proposed. It was hypothesized that XTB could have a core xylosyltransferase activity(Schulze et al., 2018).

In this work, we report on the analysis of the *N*-glycan profiles cleaved off total protein extracts of *C. reinhardtii* Wild-Type (WT), XTA and XTB single mutants, as well as the XTA/XTB double mutant using complementary approaches such as Western Blot, nanoliquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry (nanoLC-ESI-MS), multi-stage tandem mass spectrometry (ESI-MS^n) and ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry (IMS-MS^2). Results allow us to characterize the structure of xylosylated *N*-glycans in *C. reinhardtii* and to propose that XTA acts first by transferring a xylose residue onto the *N*-glycan core and that XTB is involved in the xylosylation of the $Man_5GlcNAc_2$ linear branch, as well as in the partial addition of the core β(1,2)-xylose at least when XTA is inactivated. Finally, we conclude that other xylosyltransferases are involved in the *N*-glycan xylosylation process in *C. reinhardtii*.

RESULTS

Xylosylation of glycans *N*-linked to *C. reinhardtii* proteins requires two distinct xylosyltransferases

To investigate the respective involvement of the xylosyltransferases A and B in the xylosylation of protein *N*-linked glycans in *C. reinhardtii*, XTA and XTB mutants were ordered from the CLIP library (www.chlamylibrary.org; Lucas et al., 2018). Those mutants, called IM_{XTA} and IM_{XTB} (for insertional mutants of XTA and XTB, respectively), had been generated by insertion of a paromomycin resistance cassette CIB1 by electroporation (Sizova et al., 2001; Zhang et al., 2014; Li et al., 2016). IM_{XTA} and IM_{XTB} were subjected to mating in order to generate the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant. For this purpose, IM_{XTB} initially (mt-) was first

subjected to a genetic cross with the reference strain CC-5155 (mt+) to generate an IM_{XTB} (mt+) progeny. This IM_{XTB} (mt+) was then crossed with IM_{XTA} (mt-) to generate the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant.

The presence of an insertion site of the CIB1 cassette in the respective genes was checked as described previously (Zhang et al., 2014). Two specific primer pairs were designed from either side of the CIB1 cassette in order to confirm the disruption of the xylosyltransferases A or B genes in IM_{XTA}, or in IM_{XTB}, respectively (**Figure 1A and B, Supporting Table S1**). In both mutants, polymerase chain reaction (PCR) experiments on genomic DNA (gDNA) confirmed the insertion of CIB1 cassette site in the first exon, as no fragment was amplified in IM_{XTA} or in $IM_{XTB,}$ by contrast to the reference strain (**Figure 1B**). As expected, no amplicon was observed in the double mutant IM_{XTA}xIM_{XTB} while a PCR on an unaffected test locus resulted in bands in all strains analyzed. *XTA* and *XTB* mRNA transcription levels were analyzed by reverse transcription (RT)-PCR in IM_{XTA} and IM_{XTB} as well as in IM_{XTA}xIM_{XTB} using specific primer pairs (**Supporting Table S1**) amplifying the cDNA downstream of the CIB1 cassette insertion site for XTA, XTB and the control locus (CBLP) (Jokel et al., 2015; **Figure 1A and 1C**). **Figure 1C** shows that the relative expression of *XTA* and *XTB* was reduced in insertional mutants confirming the downregulation of these genes in IM_{XTA}, IM_{XTB} as well as in the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant (**Figure 1C**).

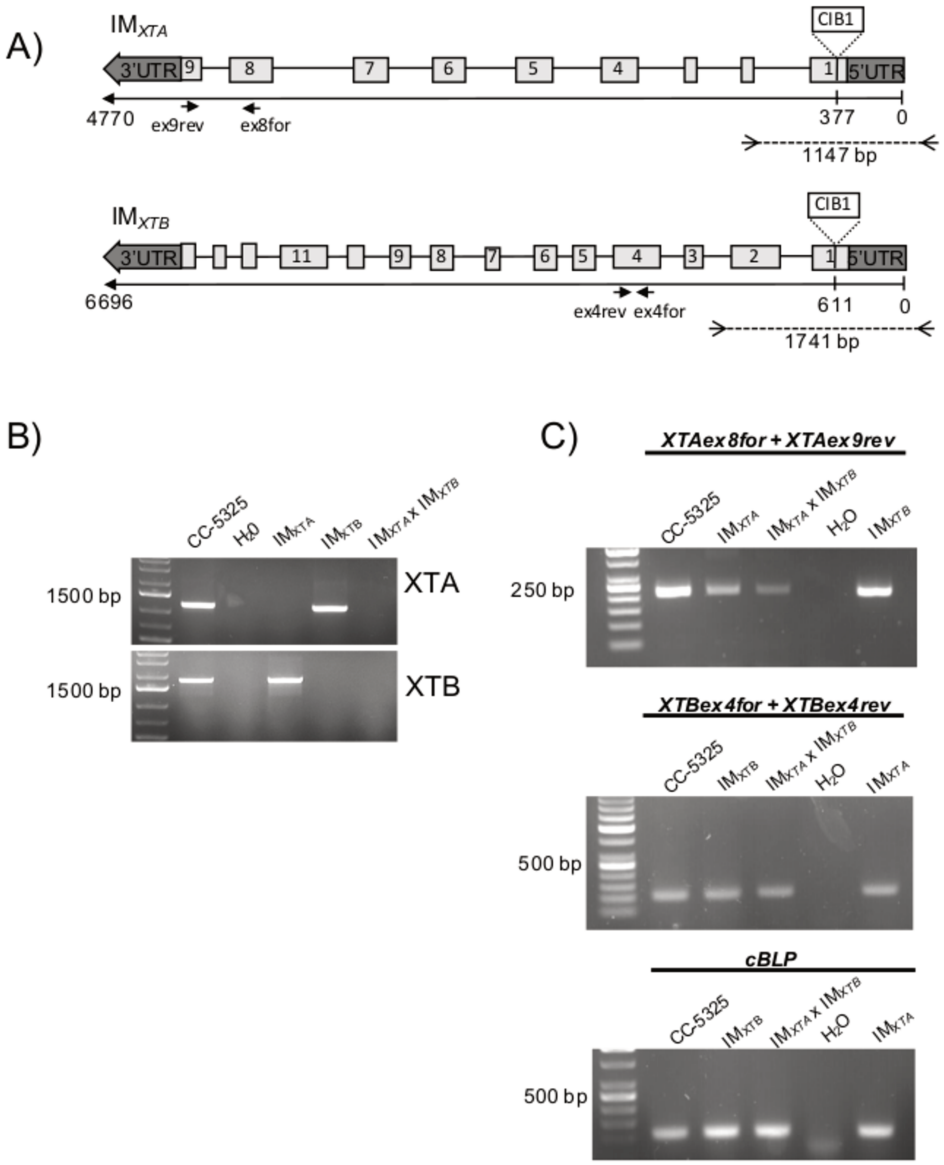


Figure 1: Molecular analysis of knock-out mutants of *C. reinhardtii*.

(A) Schemes depicting the genomic organization of *XTA* and *XTB* in the insertional mutants. In both cases, the exons are indicated by light grey boxes. *CIB1* cassette is inserted in the first exon (theorical position 377 and 611 in IM_{XTA} and IM_{XTB}, respectively). The positions of oligonucleotides used for genomic DNA (dotted arrows) and cDNA (black short arrows) amplification, in IM_{XTA}, IM_{XTB}, and in IM_{XTA}x IM_{XTB} are shown under each scheme. (B) The insertion of the CIB1 cassette in the first exon was confirmed in IM_{XTA}, since primers from either side of the cassette do not allow the amplification of the 1,147 bp expected fragment, which is amplified in the CC-5325 strain and in IM_{XTB}. Similarly, the insertion of the CIB1 cassette in the first exon was confirmed in IM_{XTB}, since primers from either side of the cassette do not allow the amplification of the 1,741 bp expected fragment in contrast to the CC-5325 strain and in IM_{XTA}. (C) RT-PCR analysis of *XTA* and *XTB* expression in $IM_{XTA,}$ IM_{XTB} and in IM_{XTA}xIM_{XTB}. The transcription levels of *XTA* and *XTB* were downregulated in insertional mutants, as well as in the double mutant. CBLP was used as a reference gene (Jokel et al., 2015).

To investigate the impact of XTA and XTB downregulation on the biosynthesis of glycans *N*-linked to proteins, *N*-glycans from WT strains (WT) and mutant lines were released from total protein extract by PNGase F as described previously (Mathieu-Rivet et al., 2013; Vanier et al., 2017). Since PNGase F is not able to cleave *N*-glycans bearing α(1,3)-fucose linked to the proximal GlcNAc of the chitobiose, only non α(1,3)-fucosylated oligosaccharides were considered in this study. The released *N*-glycans were then labeled with procainamide and analyzed by nanoLC-ESI-MS. Mass spectrometry *N*-glycan profiles from mutants were compared to profiles obtained from WT strain CC-5325 (mt^-) and CC-5155 (mt+). Ions mainly assigned to $Man_3GlcNAc_2$ to $Man_5GlcNAc_2$ were detected in the *N*-glycan profile of CC-5325 (mt^-), in addition to ions exhibiting mass shifts of 14 u and/or 132 u (**Figure S1A; Figure 2 and Supporting Table S2**). According to the literature (Mathieu-Rivet et al., 2013; Vanier et al., 2017; Schulze et al., 2018), these later ions were assigned to complex *N*-glycans composed of partially 6-*O*-methylated (+ 14 u) $Man_3GlcNAc_2$ to $Man_5GlcNAc_2$ and/or substituted with one or two xylose residues (+ 132 u). A similar *N*-glycan profile was obtained from total protein extract isolated from the CC-5155 (mt^+) progeny (**Figure S2**).

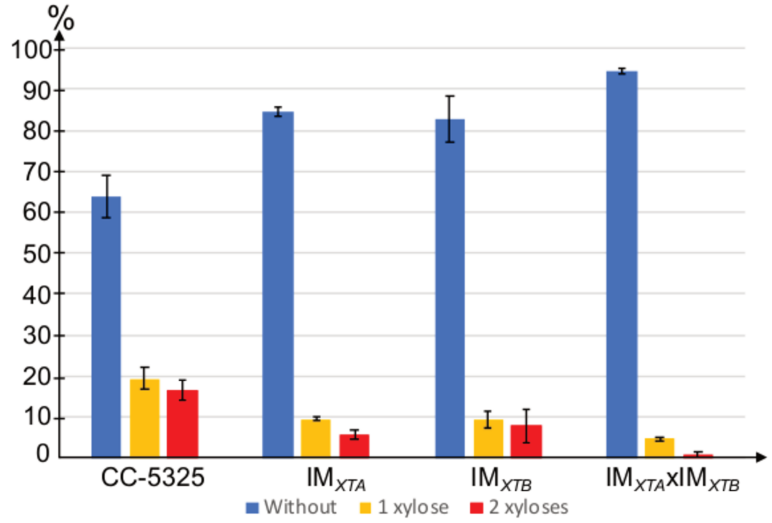


Figure 2: Relative proportion of xylosylated *N*-glycans is decreased in the IM$_{XTA}$, IM$_{XTB}$ and in IM$_{XTA}$xIM$_{XTB}$ mutants.

The relative percentage of each *N*-glycan type has been determined based on ion intensities of the procainamide-labeled *N*-glycans analysed by nano-LC-ESI-MS (**Supporting Table S2**). The relative percentages reported were determined from three independent analyses of three biological replicates.

Total proteins were also isolated from IM_{XTA} and IM_{XTB} mutants and *N*-glycan profiles were determined as performed for the WT strains. As shown in **Figure 2**, the knock-out of XTA induced a strong decrease of the *N*-glycan xylosylation with a decrease of mono- and dixylosylated species from 19.4% to 9.5% and 18% to 5.9%, respectively (**Figure 2, Figure S1B and Supporting Table S2**). A similar impact on the *N*-glycan profile of proteins was observed in the IM_{XTB} mutant, with the monoxylosylated structures and the dixylosylated *N*-glycans representing above 9.5% and 7.8% of the overall *N*-glycan population respectively (**Figure 2, Figure S1C, Supporting Table S2**). To further investigate the involvement of the two putative xylosyltransferases in protein xylosylation in *C. reinhardtii*, the *N*-glycan profile of proteins from the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant was determined using the same protocol and mass spectrometry approach (**Figure 2, Figure S1D and Supporting Table S2**). A stronger effect on the protein xylosylation was observed with a disappearance of almost all dixylosylated oligosaccharides (less than 1% of the total *N*-glycans) and a remaining of monoxylosylated *N*-glycans representing only 5%.

N-glycan xylosylation steps are mainly mediated by XTA and XTB, respectively

The respective involvement of XTA and XTB in the *N*-glycan xylosylation of *C. reinhardtii* is questionable. *N*-glycan xylosylation was investigated in mutants by immunoblot analyses. **Figure 3** shows an immunoblot analysis of the proteins secreted by WT and *C. reinhardtii* mutants using antibodies specifically directed against the core β(1,2)-xylose epitope (Fitchette et al., 2007). In contrast to the WT and IM_{XTB} proteins, a low signal was detected for proteins isolated from the IM_{XTA} mutant. This confirms that XTA encodes for a core β(1,2)-xylosyltransferase transferring a β(1,2)-linked xylose onto the core of the *N*-glycans. In contrast, proteins from the IM_{XTB} mutant were immunodetected with core β(1,2)-xylose antibodies similarly to WT. Since a strong decrease of protein xylosylation was observed in this mutant line by nanoLC-ESI-MS analysis (**Figure 2 and Figure S1C**), it can be concluded that XTB encodes for a xylosyltransferase mainly responsible for the xylosylation of α-

mannose residues of the linear branch of the oligomannosides. With regards to proteins from the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant, the immunoblot analysis did not reveal any immunodetection of core β(1,2)-xylose epitopes. Glycomic analysis of the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant showed that 5% of *N*-glycans still exhibit xylose residues. The absence of detection of proteins with antibodies specific for core β(1,2)-xylose indicated that xylose residues in the remaining monoxylosylated *N*-glycan detected in this double mutant are attached to α-mannose residues of oligomannoside α(1,3)-branch (**Figure 3**).

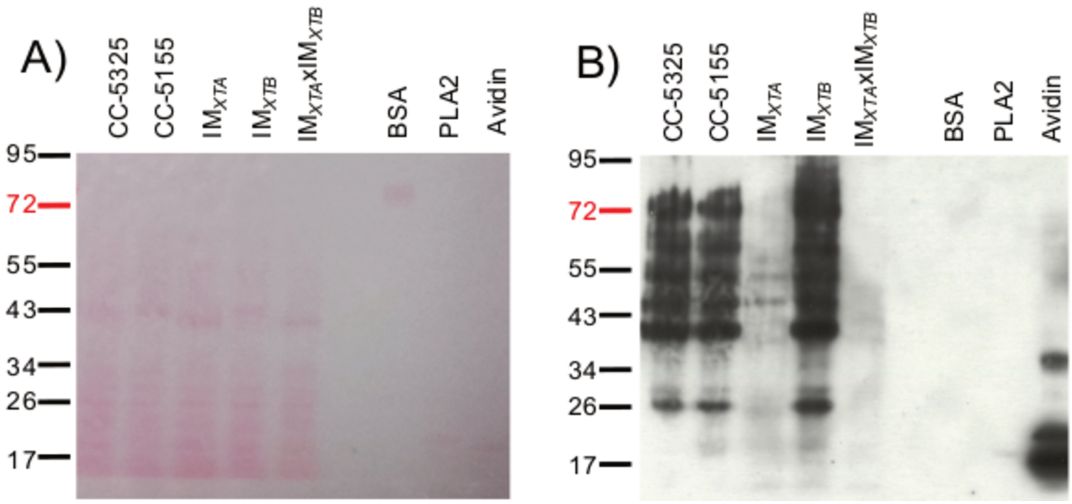


Figure 3: XTA is responsible of the core β(1,2)-xylosylation whereas XTB is involved in the xylosylation of the linear branch of *C. reinhardtii*.

Western blot analysis of protein extracts from CC-5325 (lane 1) ; CC-5155 (lane 2) ; IM_{XTA} (lane 3) ; IM_{XTB} (lane 4) ; IM_{XTA}xIM_{XTB} (lane 5) ; BSA as a negative control as it is non-glycosylated (lane 7) ; the Phospholipase A2 (PLA2) as a negative control (lane 8) and the recombinant avidin produced in corn as a positive control (lane 9). In parallel, molecular weight markers (PageRuler Plus stained Protein Ladder, Thermo Fisher) are reported in kDa. (A) Ponceau Red staining of the nitrocellulose membrane. (B) Revelation using the specific anti-β(1,2)-core xylose antibody from Agrisera.

The structure of xylosylated *N*-glycans isolated from WT and mutant lines were further investigated using ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry (IMS-MS^2) and electrospray ionization-multistage tandem mass spectrometry (ESI-MS^n) with n=2; n=3 and n=4 taking advantage of the specific transition ions as previously reported (Prien et al., 2009; Vanier et al., 2017). In this purpose, *N*-glycans were released from total proteins by PNGase F. The released *N*-glycans were purified and permethylated prior to the IMS-MS^2 and ESI-MS^n,

thus facilitating the fragmentation of the *N*-glycans into B-; Y- and BY-ion series (Domon and Costello, 1988; Plancot et al., 2014; Lucas et al., 2018). Permethylated monoxylosylated and dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ were first studied by IMS-MS^2, a reliable analytical method able to separate oligosaccharide isomers (Zhu et al., 2012; Struwe et al., 2016; Vanier et al., 2017).

The IM spectrum of the dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ from WT exhibited two ion mobilities for the doubly charged ion at *m/z* 961.5 with a drift time of 4.78 ms (isomer 1) and 5.12 ms (isomer 2), respectively (**Figure 4**). This suggests that two distinct dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ glycan isomers are *N*-linked to proteins isolated from *C. reinhardtii*. Both isomers exhibit a core xylosylation but differ about the location of the second xylosylation which occurs either on the α(1,2)-mannose (isomer 1) or on the α(1,3)-mannose (isomer 2) residue of $Man_5GlcNAc_2$. Indeed, IMS-MS^2 analysis of isomer 1 (doubly charged ion $[M+2Na]^{2+}$ at *m/z* 961.5) showed a fragmentation pattern with diagnostic ions like the B-ion at *m/z* 605.3, the Y-ion at *m/z* 1317.6 and the BY-ion at *m/z* 795.3 characteristic for the proposed structure for isomer 1 (**Figure 4**). IMS-MS^2 analysis was also performed for isomer 2 (doubly charged ion $[M+2Na]^{2+}$ at *m/z* 961.5) (**Figure 4**). Its fragmentation pattern exhibited discriminant product ions such as the B-ions at *m/z* 809.3 and *m/z* 445.3; the Y-ions at *m/z* 1477.8 and *m/z* 1113.5, the BY-ion at *m/z* 1200.7 and the internal fragment at *m/z* 836.3. Altogether, these product ions suggest that the isomer 2 is a dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ *N*-glycan bearing a core β(1,2)-xylose and a second one on the α(1,3)-mannose of the $Man_5GlcNAc_2$ *N*-glycan. The relative proportion of each isomer was estimated to be around 60% for isomer 1 and 40% for isomer 2. Identical results were obtained from the IM_{XTB} mutant (**Figure S3**). Altogether, these data demonstrate that the maturation of *N*-glycans in *C. reinhardtii* gives rise to heterogeneous dixylosylated structures.

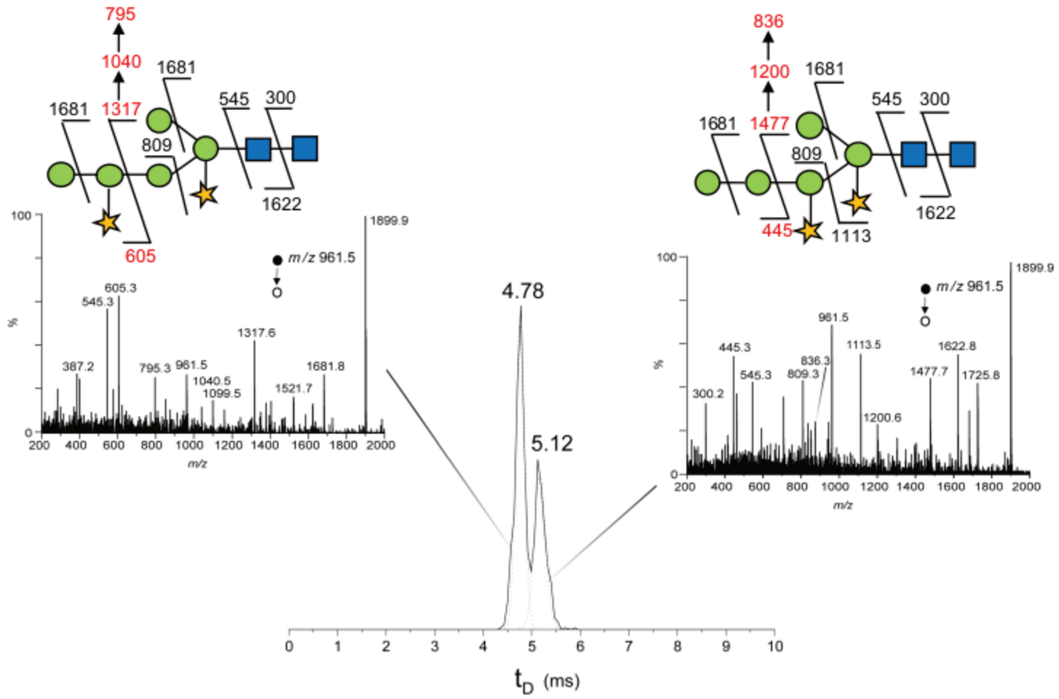


Figure 4: The *C. reinhardtii* WT presents two isomers for the dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ *N*-glycan.

ESI-IMS-MS^2 data of permethylated dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ from WT using selection of precursor ion *m/z* 961.5 ($[M+2Na]^{2+}$) with the quadrupole and collision in the transfer cell (140 eV collision energy). The ion mobility spectrum shows the presence of two isomers. Structure of each isomer was deduced from their specific MS^2 spectrum. t_D: drift time expressed in millisecond (ms).

Major structures of monoxylosylated *N*-glycans isolated from WT and mutant strains were then investigated by IMS-MS^2. A drift time of 4.5 ms (+/-0.1 ms) was observed for monoxylosylated *N*-glycan from WT, IM_{XTB}, IM_{XTA} whereas a different drift time of 4.88 ms (+/- 0.1 ms) was recorded for the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant (**Figure 5A**). This shows that monoxylosylation in IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant differs from the ones observed in WT as well as in IM_{XTA} or IM_{XTB} single mutants. In order to decipher the respective structures of the monoxylosylated *N*-glycans, we performed complementary IMS-MS^2 (**Figure 5B and 5C**) and ESI-MS^n (**Figures S4 to S6**). IMS-MS^2 spectrum of the monoxylosylated *N*-glycan ($[M+2Na]^{2+}$ at *m/z* 881.5) from total proteins isolated from IM_{XTB} exhibited product ions at *m/z* 649.3 and *m/z* 445.2 (B-ions); *m/z* 1113.6 (Y-ion) which dissociated into internal fragments of *m/z* 836.4 and *m/z* 662.3 (**Figure 5B**). The presence of these diagnostic ions demonstrate that the major

monoxylosylated *N*-glycans in IM_{XTB} mutant bear a xylose residue on the core. This structure was confirmed by ESI-MS^n (**Figure S4**). IMS-MS^2 and ESI-MS^n fragmentation patterns of the monoxylosylated *N*-glycan isolated from WT were too noisy for drawing definitive conclusions about the location of the xylose residue on the $Man_5GlcNAc_2$. However, since monoxylosylated *N*-glycans from WT and IM_{XTB} share identical IMS drift times, it can be concluded that the xylose residue in WT is also located on the core of the *N*-glycans as shown for IM_{XTB}. Monoxylosylation of *N*-glycans isolated from IM_{XTA} is more heterogeneous (**Figure S5**). Product ions at *m/z* 676.4 and *m/z* 836.5 suggested that the xylose residue was either attached to the core *N*-glycan or to the α(1,3)-mannose residue of the trimannosyl linear branch. As a consequence, we conclude that the knock-out of XTA results in a partial complementation of the core xylosylation of *N*-glycans by XTB.

The remaining monoxylosylated $Man_5GlcNAc_2$ in IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant was also analyzed by IMS-MS^2 (**Figure 5C**). The IMS-MS^2 spectrum displayed product ions at *m/z* 445.2 and *m/z* 809.4 (B-ions), *m/z* 953.5 (Y-ion) and *m/z* 676.3 (BY-ion). The ESI-MS^2 and ESI-MS^3 spectra (**Figure S6**) showed that the precursor ion $[M+2Na]^{2+}$ (*m/z* 881.5) was fragmented into *m/z* 1462.9 (B-ion) which then dissociated into BY-ions at *m/z* 1040.5, *m/z* 676.5 and into B-product ions at *m/z* 809.5 and *m/z* 445.4. Such fragmentation pattern demonstrate that the remaining xylose residue is located on the α(1,3)-mannose of the $Man_5GlcNAc_2$ *N*-glycan structure in the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant of *C. reinhardtii*. Such result suggests that additional xylosyltransferases are likely involved in the processing of *C. reinhardtii N*-glycans.

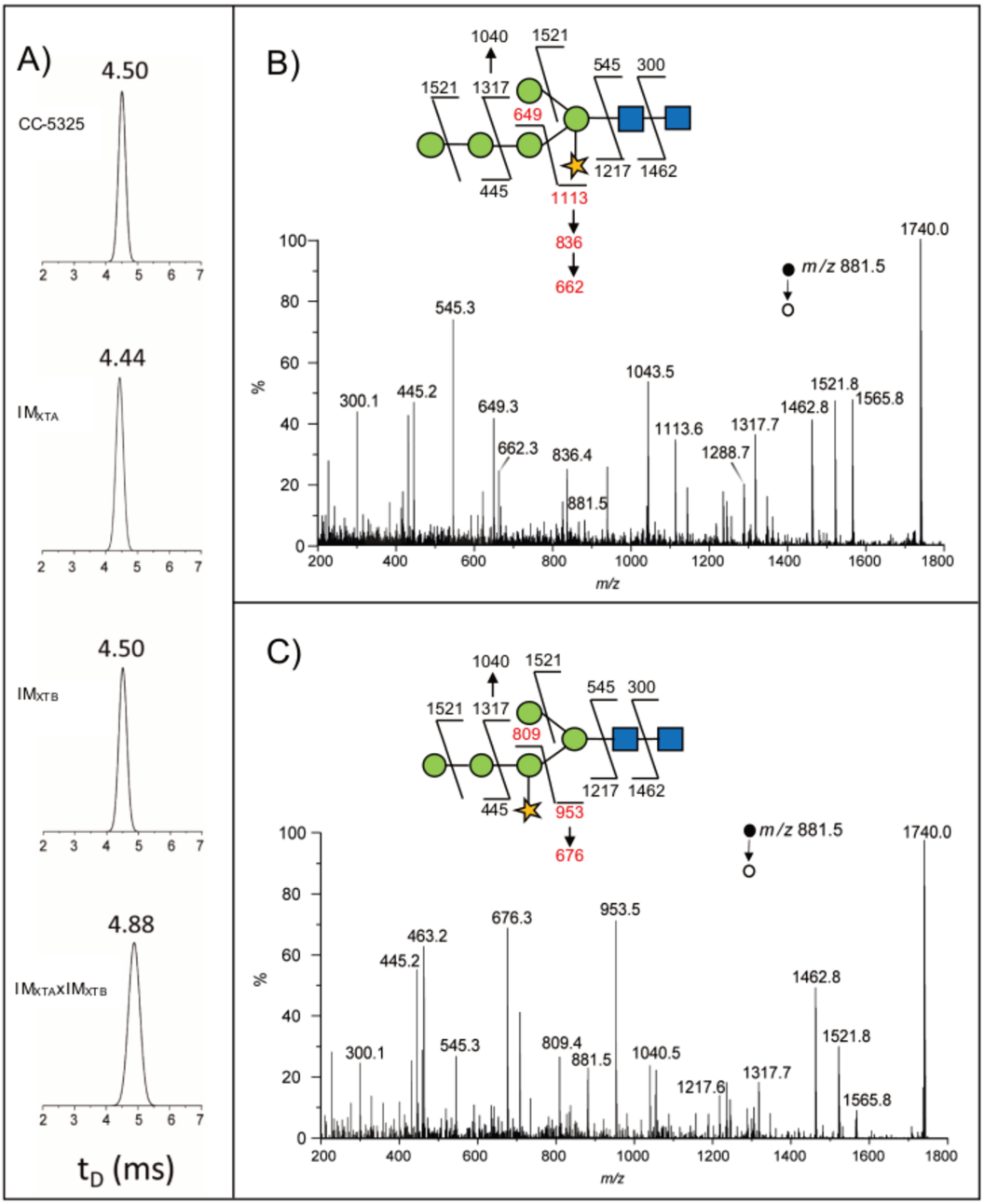


Figure 5: Identification of the location of the xylose residue in the monoxylosylated *N*-glycans of *C. reinhardtii*.

(A) Ion mobility spectra of doubly charged ion at *m/z* 881.5 ($[M+2Na]^{2+}$) of permethylated monoxylosylated $Man_5GlcNAc_2$ isolated from WT, IM_{XTA}, IM_{XTB} and $IM_{XTA}xIM_{XTB}$ lines. (B) and (C) ESI-IMS-MS^2 spectra of *m/z* 881.5 precursor ion isolated from IM_{XTB} single mutant (B) and $IM_{XTA}xIM_{XTB}$ double mutant (C) using a collision energy of 140 eV in the transfer cell. Note that only major structures which could be detected by our instrument in our operating conditions are reported in Figure 5.

***N*-glycan xylosylation in *C. reinhardtii* involves a multigene xylosyltransferase family.**

An i*n silico* search for additional putative xylosyltransferase candidates was performed using *XTA* and *XTB* as query sequences using TBLASTN. Three putative genes of which the translated amino-acid sequences showed 12 to 16% of identity with *XTA*, were identified as Cre10.g458950, Cre13.g588750 and Cre08.g361250. XTA, XTB and the three additional putative *C. reinhardtii* xylosyltransferases were compared to core β(1,2)-xylosyltransferases previously functionally characterized in *Arabidopsis thaliana* (Strasser et al., 2004), *Solanum lycopersicum* (Paulus et al., 2011), *Oryza sativa* (Shin et al., 2011), *Lemna minor* (Cox et al., 2006), *Medicago sativa* (Sourrouille et al., 2008) and *Physcomitrella patens* (Koprivova et al., 2004) (**Figure 6**). The phylogenic tree showed that *C. reinhardtii* and plant xylosyltransferases are distributed in two distinct clades (**Figure 6A**). Although *C. reinhardtii* protein sequences share a low percentage of identities with plant XT (less than 12%), a common motif in the C-terminal part of the protein could be predicted as a glycosyltransferase motif (IPR007657) found in the CAZy GT61 family (**Figure 6B**). This glycosyltransferase family gathers β(1,2)-xylosyltransferases, protein O-β-N-acetylglucosaminyltransferases and xylan α(1,3)-arabinofuranosyltransferases (http://www.cazy.org/GT61.html).

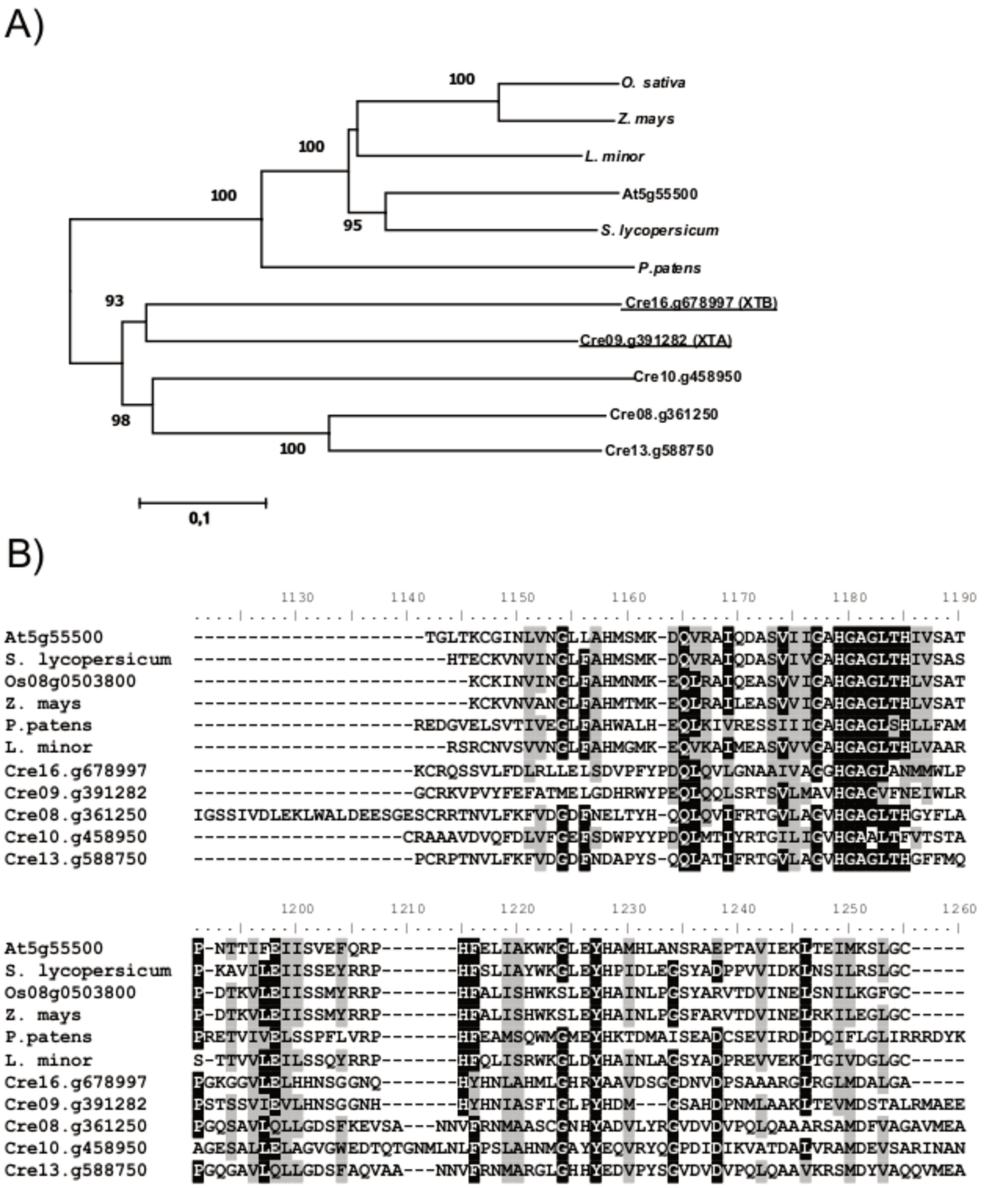


Figure 6: Phylogenetic relationships between plant and *C. reinhardtii* xylosyltransferases.

The putative protein sequences of xylosyltransferases from *C. reinhardtii* were compared to sequences from *Oryza sativa* (Os08g0503800), *Zea mays* (NP_001105845.1), *Lemna minor* (ABG89269.1), *Arabidopsis thaliana* (At5g55500), *Solanum lycopersicum (*NP_001311390.1*)*, and *Physcomitrella patens* (CAD22108.1). The protein sequences alignment was performed with ClustalW and then the tree (A) was deduced using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). Only significant values (> 50) are shown. The evolutionary distances were computed using the p-distance method (Nei and Kumar, 2000) and are in the units of the number of amino acid differences per site. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 1,274 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar et al., 2016). (B) Sequences encoding for putative xylosyltransferases from *C. reinhardtii* exhibit a characteristic GT61 motif in their *C*-terminal part. Conserved amino acid residues are shaded black (identities) and grey (similarities). Dashed lines represent gaps inserted for optimal alignment of the sequences.

DISCUSSION

Processing of *C. reinhardtii N*-glycans by XTA and the α-mannosidase Man1A was previously reported (Schulze et al., 2018). Based on a glycoproteomic analysis performed on proteins secreted by different mutants of *C. reinhardtii*, XTA was shown to be involved in the *N*-glycan core xylosylation while Man1A was proposed to be involved in *N*-glycan trimming. Unexpectedly, a double mutant of Man1A and XTA showed core β(1,2)-xylose residues. Consequently, XTB (Cre16.g678997) was proposed as additional core xylosyltransferase (Schulze et al., 2018). In the present study, involvement of XTA and XTB in the xylosylation processing of *C. reinhardtii N*-glycans was investigated by studying protein *N*-glycan profiles in IM_{XTA}, IM_{XTB} single mutants and in IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant. Different mass spectrometry approaches such as nano-LC-ESI-MS, IMS-MS^2 and ESI-MS^n were combined. Two isomers corresponding to dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ were discriminated based on their ion mobility. MS^n fragmentation patterns of permethylated samples allowed the determination of the location of xylose residues in these structures. Taking together, analyses of WT and mutant lines confirmed that both XTA and XTB proteins are involved in the *N*-glycan xylosylation.

As proposed in **Figure 7**, the data from the present study confirmed that XTA is responsible for the transfer of the core β(1,2)-xylose residue. By contrast, the knock-out of *XTB* resulted in *N*-glycans exhibiting one core β(1,2)-xylose. On the other hand, xylosylation of α-mannose residues of the linear trimannosyl arm is a more sophisticated process involving at least two xylosytransferases with likely dual substrate specificities. First of all, dixylosylated *N*-glycans from WT is a mix of two isomers exhibiting either a xylose residue attached to the α(1,2)-mannose or to the α(1,3)-mannose of $Man_5GlcNAc_2$. Meanwhile, *N*-glycan monoxylosylation in IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant only occurs on the α(1,3)-mannose residue of the trimannosyl linear branch. Therefore, we hypothesize that an additional xylosyltransferase, distinct from XTA and XTB, is involved in the processing of mature *N*-glycans in *C. reinhardtii* and is responsible for the transfer of a xylose residue on the α(1,3)-mannose of the linear branch. In contrast, the acceptor substrate specificity of XTB seems to be lower. Considering

the structure of dixylosylated *N*-glycans in WT and monoxylosylated *N*-glycans in IM$_{XTA}$xIM$_{XTB}$ double mutant (**Figure 7**), XTB is supposed to catalyze the transfer of the second xylose residue onto the first α(1,2)-mannose of the linear trimannosyl branch (**Figure 7**). However, residual core β(1,2)-xylose was observed in IM$_{XTA}$ (**Figure 3**) while the monoxylosylated form in IM$_{XTA}$xIM$_{XTB}$ was proven to lack core β(1,2)-xylose (**Figure 5**). This suggests that, in absence of XTA, XTB is able to partially transfer β(1,2)-xylose residues onto the *N*-glycan core. This dual activity is consistent with results described in Oltmanns et al., 2019 (the same journal issue) and with data previously reported by Schulze et al. (2018) on the *N*-glycosylation of proteins in an Man1A /XTA double mutant. Consequently, we cannot rule out that the core xylosylation in WT is also partly due to XTB. Altogether, these results suggest that XTB may exhibit a low acceptor substrate specificity in contrast to glycosyltransferases that usually possess a strict acceptor substrate specificity (Rini et al., 2009).

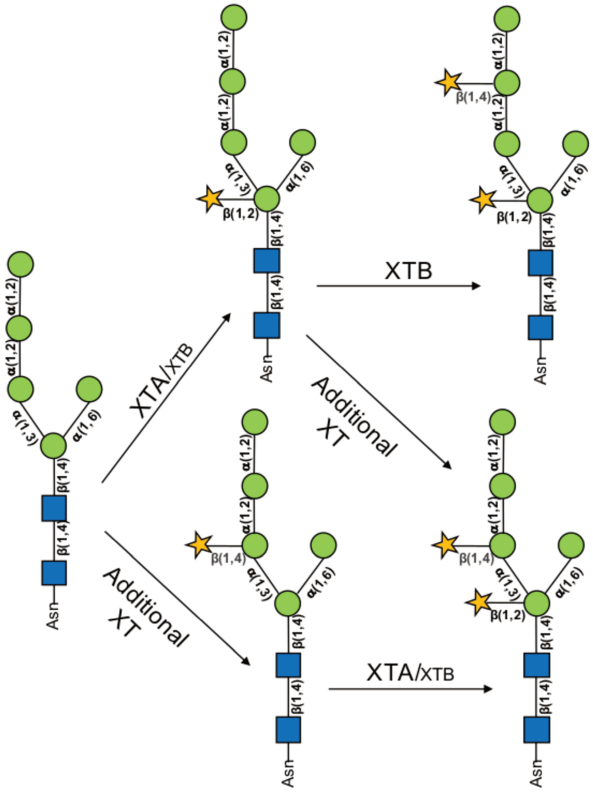


Figure 7: Proposed xylosylation processing in *C. reinhardtii* *N*-glycosylation pathway.

The scheme proposed the involvement of XTA, XTB and the additional XT in the xylosylation pathway of complex *N*-glycans in *C. reinhardtii*. Structures are draw according to the glycan nomenclature described in (Varki et al., 2015).

$IM_{XTA}xIM_{XTB}$ double mutant presents remaining *N*-glycan xylosylation. The xylose residue of the monoxylosylated *N*-glycan from this mutant was found to be linked to the α(1,3)-mannose residue of the trimannosyl linear branch. We hypothesize that an additional XT might be involved in the processing of complex-type *N*-glycans in *C. reinhardtii*. We propose that this xylosyltransferase is responsible for the xylosylation of the α(1,3)-mannose of the linear branch (**Figure 7**). This additional XT is likely specific for the α(1,3)-mannose xylosylation but not dependent on core xylosylation since no core β(1,2)-xylose was detected in the $IM_{XTA}xIM_{XTB}$ double mutant while α(1,3)-mannose xylose was found. A genome-wide analysis identified three genes encoding for other putative XT. Although the three predicted proteins encoding by these genes in *C. reinhardtii* would not have transmembrane domain as usually required for Golgi-resident enzymes and glycosyltransferases(Strasser et al., 2000), they share a common *C*-terminus end motif with XTA and XTB as well as with plant β(1,2)-xylosyltransferases. This predicted glycosyltransferase motif (IPR007657) is found in the CAZy GT61 family and is required for XT activity (Pagny et al., 2003; Bencúr et al., 2005; Klutts et al., 2007). Considering that XTA and XTB were demonstrated to be involved in *N*-glycan xylosylation in *C. reinhardtii*, proteins encoded by either Cre10.g458950, Cre13.g588750 or Cre08.g361250 are XTspecific for the α(1,3)-mannose xylosylation. It is worth noting that xylosylation in plant *N*-glycans only occurs on the β-mannose residue of the core and that plant XTs specifically use $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ as a substrate, a glycan sequence that results from a Golgi processing involving GnT I and II and the α-mannosidase II (Lerouge et al., 1998; Pagny et al., 2003). Although core xylosylation in *C. reinhardtii* and in plants gives rise to a common core β(1,2)-xylose motif, XTA and XTB occurs on the β-mannose residue of the core of oligomannoside substrates in a GnT I independent manner (Mathieu-Rivet et al., 2013; Vanier et al., 2017) and independently of the $K^{57}PWP^{60}$ motif which has been demonstrated to be essential for the activity of the β(1,2)-xylosyltransferase of *A. thaliana* (Bencúr et al., 2005). Moreover, XTB is involved in the xylosylation of α(1,2)-mannose residues which occurs in the linear trimannosyl arm of *C. reinhardtii* or partly in the core xylosylation of *C. reinhardtii* (Schultz et al., 2018;

Oltmanns et al., 2019, the same journal issue). Such XT activity has never been studied so far. Thus, it would be interesting in future work to characterize enzymatically the XTB looking for example at its substrate specificity, K_m, V_{max}, optimal pH as well as determining the amino acids that are essential for the catalytic activity of XTB. In regards to the other putative XT, further analysis such as inactivation of these XT would definitively help to decipher their implication in the *N*-glycosylation pathway of *C. reinhardtii*. Since the xylosylation is unique in *C. reinhardtii* and that many *N*-glycosylated proteins in *t*his organism are secreted and involved in important physiological processes such as nutrient acquisition and movement of the cells (Bloodgood, 2009; Mathieu-Rivet et al., 2013; Schulze et al., 2018), it will be interesting to identify *C. reinhardtii* proteins which are specifically bearing core and terminal xylose residues and evaluate whether those glyco-epitopes are playing a critical physiological roles for the microalgae. Moreover, investigating xylosylation of other chlorophyta and microalgae from different phyla would help to decipher the evolution of the *N*-glycosylation pathways, especially regarding the xylosylation processing.

Since a couple of decades, *C. reinhardtii* has been investigated as a potential biofactory for the production of protein based-pharmaceuticals (Barrera and Mayfield, 2013; Mathieu-Rivet et al., 2014; Rasala and Mayfield, 2015; Hempel and Maier, 2016). Substantial portion of the protein based-pharmaceuticals such as monoclonal antibodies, erythropoietin are glycosylated proteins (Walsh, 2010; Mathieu-Rivet et al., 2017) and it is well established that the *N*-glycosylation of the protein represents a critical quality attribute influencing the half-life of the protein, its biological activity as well as its safety and immunogenicity (Lingg et al., 2012; Buettner et al., 2018; Mimura et al., 2018). Indeed, glyco-epitopes that are absent in mammalian cells could be immunogenic when proteins carrying such decorations are injected into humans (van Beers and Bardor, 2012). Putative immunogenicity of *N*-glycoproteins produced in plants have been attributed to α(1,3)-fucose and core β(1,2)-xylose epitopes (Wilson and Altmann, 1998; Bardor et al., 2003; Schähs et al., 2007). This question is still a matter of debate as several studies have demonstrated the presence of antibodies raised

against plant glyco-epitopes in humans following injections of plant proteins (Bardor et al., 2003; Landry et al., 2010; Ward et al., 2014) whereas others reported no adverse effects (Aviezer et al., 2009; Tandan et al., 2017). Nevertheless, we must be careful and consider production of protein-based pharmaceuticals in *C. reinhardtii*, which are completely deficient in *N*-glycan xylosylation. The use of the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant described here would already be of interest as it can be expected, based on the results from this study, that the recombinant protein carry less than 1% of dixylosylated *N*-glycans and 5% of monoxylosylated.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strain

CC-5325 (mt-) *C. reinhardtii* strain was used as a WT strain in this study as it represents the original strain, which has been used to generate the mutants in the CLIP library (Zhang et al., 2014; Li et al., 2016). *C. reinhardtii* IM_{XTA} (LMJ.RY0402.087519) and IM_{XTB} (LMJ.RY0402.118417) insertional mutants were ordered from the CLIP library (https://www.chlamylibrary.org). Those mutants were generated by random insertion through electroporation of a paromomycin resistance cassette CIB1 (Sizova et al., 2001; Zhang et al., 2014; Li et al., 2016). CC-5155 (mt+) *C. reinhardtii* strain was used as an intermediate for the genetic crossing.

Growth conditions

All *C. reinhardtii* strains were grown photoheterotrophically in TAP (Tris Acetate Phosphate) medium (Andersen, 2005) at 23°C and continuous illumination at 150 μmol(photon) m^{-2} s^{-2}, either as liquid cultures shaking at 150 rpm or on TAP plates containing 1.5% agar according to (Vanier et al., 2017; Lucas et al., 2018).

Genetically crossing of *C. reinhardtii* strains for generating the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant

IM_{XTB} (mt+) was crossed with IM_{XTA} (mt-). Both (mt+) and (mt-) progenies were grown on Petri dishes containing TAP N10 medium (same as TAP except the amount of ammonium chloride which is divided by ten) and 1.5% of agar during three days. Strains were then inoculated in 2 mL of distillated water and incubated during 30 min with 60 μE of light, at 23°C and under agitation at 150 rpm. Then, both (mt-) and (mt+) cultures were mixed together and incubated at 23°C under 60 μE of light without agitation during 6 h to allow matching. One mL of mixed strains was deposited over TAP 4% agar Petri dishes and dry under hood. Petri dishes were incubated during one night under 60 μE of light at 23°C and finally in the dark at 23°C during at least one week in order to generate tetrades. Tetrades were harvested using binocular microscope. Each spot of mating cells was scraped using a scalpel and the remaining tetrades which are bigger than vegetative cells and adhere more to agar, were excised and inoculated with 600 μL of TAP medium under 60 μE of light at 23°C. After one night, tetrades were detached from agar, pipetted up and down, and were transferred on TAP 1.5% agar plates for 4 days at 23°C under 150 μE of light. Finally, single colonies resulting from the crossing were analyzed by PCR in order to identify IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant as described below.

Identification of the cassette insertion site in genomic DNA

Cassette insertion site in the different IM_{XTA} and IM_{XTB} single mutants as well as in the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant has been checked in genomic DNA samples as recommended in (Zhang et al., 2014; Li et al., 2016). Specific primers (**Supporting Table S1**) were used for PCR analysis as recommended in (Zhang et al., 2014; Li et al., 2016).

RNA extraction

C. reinhardtii cells were grown during 96 h in 20 mL of TAP medium at 23°C and 150 rpm until reaching a concentration of 20.10^7 cells.mL^{-1}. After a centrifugation step of 15 min at 4,500 g,

cells were transferred in 2 mL Lysing Matrix D tubes (MPbiomedicals) containing 1 mL of Trizol® (TRIzol RNA isolation reagent, Thermofisher). Cells were grinded using a high-speed homogenizer (Fast Prep-24 5G™ High Speed Homogenizer, MPbiomedicals) during 2 cycles of 30 s at 6.5 $m.s^{-1}$ with a cooling step of 2 min on ice between cycles. Samples were centrifuged for 5 min at 14,000 g. The supernatant was transferred in a 1.5 ml Eppendof tube and 200 μL chloroform (LC-MS grade, Fisher Chemical) were added. After centrifugation for 15 min at 12,000 g at 4°C, the upper aqueous phase was transferred in a new tube and the same volume of isopropanol was added in order to precipitate RNA. After 15 min at room temperature, the sample was centrifuged at 16,500 g during 15 min. The resulting pellet was washed with 400 μL of 70% ethanol and centrifuged 20 min at 17,000 g. The resulting pellet was dried and then dissolved in 40 μL of water (Molecular biology grade, Fisher Scientific). Enzymatic degradation of contaminating DNA was performed on 20 μL of RNA sample with 1 μL Turbo DNAse and 5 μL of appropriate buffer in 50 μL completed with water (Molecular biology grade, Fisher Scientific) as recommended in the TURBO DNA-free kit (ThermoFisher Scientific). After 30 min at 37°C, samples were cooled down for 5 min at room temperature and finally, 5 μL of the stop reaction were added. The samples were centrifuged for 1 min at 10,000 g and the resulting supernatant containing RNA were stored at -80°C before use.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Reverse transcription was performed on RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (ThermoFisher Scientific). Briefly, an equivalent amount of 2 μg of RNA was resuspended in 10 μL of water (Molecular biology grade, Fisher Scientific) and mixed with 1 μL of Multiscribe® Reverse Transcriptase, 2 μL of 10 X random primers, 0.8 μL of dNTP mix (100 mM), 2 μL of 10 X RT buffer, 1 μL of RNase inhibitor (N8080119, Applied Biosystem) in 20 μL of total volume completed with water. Reverse transcription reaction was done in a thermocycler (Labcycler, SensoQuest) starting with 10 min at 25°C, follow by 2 h at 37°C for

reverse transcription. Reverse transcriptase was then inactivated at 87°C during 5 min. cDNA samples were finally cooled down at room temperature and stored at -20°C.

Total protein extraction of *Chlamydomonas reinhardtii* cells

Cells were grown during 96 h in 200 mL of TAP medium at 23°C and 150 rpm until reaching an optical density 20.10^7 cells.mL^{-1}. A centrifugation at 4 500 g using a Beckman Coulter Allegra® X-15 R centrifuge with SX4750A rotor for 10 min was then performed in order to pellet the cells. The resulting cell pellets were resuspended in 2 mL Agrisera 1X protein extraction buffer (AS08 300, Agrisera). The cells were grinded using a high-speed homogenizer (Fast Prep-24 5G™ High Speed Homogenizer, MPbiomedicals) in a Lysing Matrix D tubes (MPbiomedicals). Five cycles of 30 s at 6.5 m.s^{-1} with 2 min on ice between each cycle were performed. Tubes are then centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C. Each remaining pellet is resuspended in 1 mL of phosphate buffer and then, four new cycles of 30 s at 6.5 m.s^{-1} with a cooling step of 2 min between each cycle. The resulting supernatants containing the cell lysate were pooled.

Immunoblotting using anti-β(1,2)-xylose specific antibodies

C. reinhardtii protein extracts were separated on a NUPAGE 4-12% gel electrophoresis and were electrotransferred onto nitrocellulose membrane as previously described (Zhang et al., 2019). Immunodetection with anti-β(1,2)-xylose specific antibodies (**AS07 267 ;** Agrisera, Vannas, Sweden) was performed according to Fitchette et al., 2007.

***C. reinhardtii N*-glycan purification**

One mg of total protein extract was dissolved in 500 mL of 100 mM Tris-HCl pH 8 containing 0.1% SDS and heated at 100°C during 10 min. After cooling down at room temperature, 500 mL of Tris-HCl pH 8 containing 0.5% nonidep NP40 (IGEPAL, SIGMA) were added. Ten U of PNGase F (Roche) were then added to the sample which was incubated at 37°C during 24 h under 150 rpm agitation. After deglycosylation, the proteins were precipitated with 4 volumes of ethanol (LC-MS grade, Fisher Chemical) at -20°C during 72 h. After a centrifugation step of

15 min at 10 000 g, the ethanol supernatant containing the *N*-glycans were transferred in new a tube and dried under air stream. Released *N*-glycans were purified using a carbograph column (Hypercarb™ SPE Cartridges, Thermo Scientific) as previously described in North et al., 2010. The eluted fractions were finally dried down.

_N_-glycan labeling with procainamide

Released *N*-glycans from *C. reinhardtii* were labeled using the procainamide Glycan Labeling kit (LudgerTag PROC Glycans labeling kit, LT-KPROC-VP24) according to the manufacturer's instructions. Then, the procainamide-labeled *N*-glycans were purified using LudgerClean™ S cartridges following the manufacturer's instruction. After elution, labeled *N*-glycans were dried down prior to mass spectrometry.

LC-ESI-MS

Dried procainamide labeled *N*-glycans resuspended in acetonitrile 5%/formic acid 0.1% were analyzed with a nano-LC1200 system coupled to a Q-TOF 6545 XT AdvanceBio mass spectrometer equipped with a nanospray source and an HPLC-chip cube interface (Agilent Technologies, U.S.A). A 26 min linear gradient (5–85% acetonitrile in 0.1% formic acid), at a flow rate of 450 $nL.min^{-1}$, was used to separate the labeled *N*-glycans on Graphitized carbon-Chip column (150 mm long x 75 µm inner diameter). Full autoMS1 scans from 290 to 3,200 *m/z* and $autoMS^2$ from 59 to 3,200 *m/z* were recorded. In every cycle, a maximum of 5 precursors sorted by charge state (1+ preferred) were isolated and fragmented in the collision cell with fixed collision energy (CE 25, 30, 35 and 45 eV). Active exclusion of these precursors was enabled after 1 spectrum within 0.2 min, and the absolute threshold for precursor selection was set to 1,000 counts (relative threshold 0.001%). Scan speed varied based on precursor abundance (15,000 count/spectrum) and with 100% purity stringency and 30% purity cutoff. Datasets were analyzed using the software Qualitative Analysis B.05.00. MS data analysis was performed with an average of minimum 20 scans for procainamide labeled *N*-glycans.

Permethylation of *N*-glycans

N-glycans were permethylated and purified according to Vanier et al., 2017 and Lucas *et al.*, 2018.

ESI-MS^n analysis

Permethylated *N*-glycans were analyzed by ESI-MS^n (n=2 to 3) using a Bruker HCT Ultra ETD II quadrupole ion trap (QIT) mass spectrometer equipped with the Esquire control 6.2 and Data Analysis 4.0 softwares (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The ESI parameters, in positive ion mode, were as followed: capillary voltage set at −3.5 kV, end plate offset at -500 V, skimmer and capillary exit voltages set at 40 V and 150 V, respectively, nebulizer gas (N_2), pressure, drying gas (N_2) flow rate and drying gas temperature were 30 psi, 7.0 L.min^{-1} and 300 °C, respectively. Helium pressure in the ion trap was 13.10^{-5} mbar. The data were acquired using a 100–2,200 *m/z* range, using a scan speed of 26,000 *m/z* per second. The number of ions entering the trap cell was automatically adjusted by controlling the accumulation time using the ion charge control (ICC) mode (target 100,000) with a maximum accumulation time of 50 ms. The injection low-mass cut-off (LMCO) value was *m/z* 120. The values of spectra averages and rolling average were 5 and 2, respectively. ESI-MS^n experiments were carried out by collision-induced dissociation (CID) using helium as the collision gas, isolation width of 2 *m/z* unit for the precursor ions and for the intermediate ions using a resonant excitation frequency with an amplitude from 0.8 to 0.9 Vp–p. Sample solutions (resuspension in 120 µL of CH_3OH/H_2O, 1/1, v/v) were infused into the source at a flow rate of 180 µL.h^{-1} by means of a syringe pump (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, USA). External calibration was performed using the 'tuning mix' from Agilent Technologies (Santa Rosa, CA, USA). All mass spectra were manually interpreted, based on literature (Domon and Costello, 1988; Prien et al., 2009; Vanier et al., 2017). The Glycoworkbench software v2.1 was used to support and confirm the assignment of the fragment ions. The ESI-MS^n spectra showed fragment ions resulting from

the characteristic fragmentation pathways of a specific chemical structure and consequently helped in identifying the oligosaccharide structure according to Prien et al., 2009.

IMS-MS^2

The IMS-MS^2 experiments were performed using a Waters SYNAPT G2 hybrid quadrupole/HDMS instrument equipped with an ESI LockSpray™source, the MassLynx 4.1 and the DriftScope 2.2 softwares (Waters, Manchester, UK). The SYNAPT HDMS system was calibrated using sodium formate cluster ions (2 mg.mL^{-1}) and operated in Sensitivity Mode (resolution 10,000 FWHM). The ESI parameters were in positive ion mode: capillary voltage, 3.1 kV; sample cone voltage, 80 V; source temperature, 100°C; desolvation temperature, 250 °C; desolvation gas flow (N_2), 700 L.h^{-1} and cone gas flow (N_2), 30 L.h^{-1}. The data were acquired using a 50–2000 *m/z* range with 1 s scan time and 0.02 s interscan delay. Sample solutions were infused into the source at a flow rate of 300 µL.h^{-1} with a syringe pump (Cole-Palmer, Vernon Hills, Illinois, USA). The IMS conditions were optimized as followed: gas flow (N_2), 70 mL.min^{-1}; IMS pressure, 3.00 mbar; wave height voltage, 40 V and wave velocity, 700 m.s^{-1}. IMS-MS^2 experiments, acquired for approximately 4 min, involved selection of $[M+2Na]^{2+}$ precursor ion with the quadrupole mass analyzer within a 1 *m/z* unit window and fragmentation in the transfer collision cell (collision voltage, 70 V) to generate product-ions after the mobility separation. The ion mobility spectra were fitted using the Origin 9.0 software (OriginLab).

AVAILABILITY OF BIOLOGICAL MATERIEL

Biological material will be available on request.

FUNDINGS

The authors thank the European Regional Development Fund (ERDF, N°31708), the Region Normandie (Crunch Network, N°20−13; SFR NORVEGE), the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029), the Institut Universitaire de France (IUF) and the University of Rouen Normandie for financial support.

ACKOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Agilent Technologies for the fruitful collaboration and support.

SHORT LEGENDS FOR SUPPORTING INFORMATION

Figure S1: NanoLC-ESI-MS analysis of procainamide labeled *N*-glycans isolated from total protein extracts of *C. reinhardtii* WT and mutant lines revealed a decreased of xylosylation level in the mutants.

Figure S2: NanoLC-ESI-MS analysis of procainamide labeled *N*-glycans isolataed from total protein extracts of *C. reinhardtii* CC-5155 (mt+) revealed a similar glycosylation pattern as the one obtained for the CC-5325 (mt-).

Figure S3: The dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ *N*-glycan from the IM_{XTB} mutant presents two isomers, which are identical to the ones described for the WT.

Figure S4: The ESI-MS^n of the monoxylosylated structure of the IM_{XTB} mutant confirmed the structure identified by IMS-MS^2.

Figure S5: ESI-MS^n analysis of IM_{XTA} mutant confirmed the heterogenous positions of the xylose residue in the monoxylosylated $Man_5GlcNAc_2$ *N*-glycan.

Figure S6: The ESI-MS^n analysis of the monoxylosylated structure of the IM_{XTA}xIM_{XTB} double mutant confirmed the structure identified by IMS-MS^2.

Supporting Table S1: List of primers used.

Supporting Table S2: Relative proportion of procainamide labeled *N*-glycan extracts from CC-5325 used as a WT, IM_{XTA}, IM_{XTB} and IM_{XTA}xIM_{XTB} mutants.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.B., N.M.B, E.M.R., P.L.L., P.L., M.H., C.A. planned and designed the research; P.L.L., E.M.R., P.C., C.P., A.O., C.L.B. performed the experiments; P.L.L., E.M.R., P.C., C.P., C.L.B. collected and analyzed data; M.B., N.M.B, E.M.R., P.L.L., C.L.B., P.L. interpreted data; M.B., N.M.B, E.M.R., P.L.L., C.L.B., P.L. wrote the manuscript. All the authors have read and agreed on the manuscript prior to the submission.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Functional and structural diversity of the endoplasmic reticulum 1833, 2430–2437. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.001

Andersen, R.A., 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier.

Aviezer, D., Brill-Almon, E., Shaaltiel, Y., Hashmueli, S., Bartfeld, D., Mizrachi, S., Liberman, Y., Freeman, A., Zimran, A., Galun, E., 2009. A Plant-Derived Recombinant Human Glucocerebrosidase Enzyme—A Preclinical and Phase I Investigation. PLOS ONE 4, e4792. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004792

Baïet, B., Burel, C., Saint-Jean, B., Louvet, R., Menu-Bouaouiche, L., Kiefer-Meyer, M.-C., Mathieu-Rivet, E., Lefebvre, T., Castel, H., Carlier, A., Cadoret, J.-P., Lerouge, P., Bardor, M., 2011. N-Glycans of Phaeodactylum tricornutum Diatom and Functional Characterization of Its N-Acetylglucosaminyltransferase I Enzyme. Journal of Biological Chemistry 286, 6152–6164. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.175711

Balshüsemann, D., Jaenicke, L., 1990. The oligosaccharides of the glycoprotein pheromone of Volvox carteri f. nagariensis Iyengar (Chlorophyceae). European Journal of Biochemistry 192, 231–237. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19220.x

Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A.-C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L., Lerouge, P., 2003. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core α(1,3)-fucose and core xylose. Glycobiology 13, 427–434. https://doi.org/10.1093/glycob/cwg024

Barrera, D.J., Mayfield, S.P., 2013. High-value Recombinant Protein Production in Microalgae, in: Handbook of Microalgal Culture. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 532–544. https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch27

Bencúr, P., Steinkellner, H., Svoboda, B., Mucha, J., Strasser, R., Kolarich, D., Hann, S., Köllensperger, G., Glössl, J., Altmann, F., Mach, L., 2005. Arabidopsis thaliana β1,2-xylosyltransferase: an unusual glycosyltransferase with the potential to act at multiple stages of the plant N-glycosylation pathway. Biochemical Journal 388, 515–525. https://doi.org/10.1042/BJ20042091

Bloodgood, R.A., 2009. Chapter 11 - The Chlamydomonas Flagellar Membrane and Its Dynamic Properties, in: Harris, E.H., Stern, D.B., Witman, G.B. (Eds.), The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition). Academic Press, London, pp. 309–368. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00048-4

Buettner, M.J., Shah, S.R., Saeui, C.T., Ariss, R., Yarema, K.J., 2018. Improving Immunotherapy Through Glycodesign. Front. Immunol. 9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02485

Cox, K.M., Sterling, J.D., Regan, J.T., Gasdaska, J.R., Frantz, K.K., Peele, C.G., Black, A., Passmore, D., Moldovan-Loomis, C., Srinivasan, M., Cuison, S., Cardarelli, P.M., Dickey, L.F., 2006. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant Lemna minor. Nature Biotechnology 24, 1591. https://doi.org/10.1038/nbt1260

Domon, B., Costello, C.E., 1988. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. Glycoconjugate J 5, 397–409. https://doi.org/10.1007/BF01049915

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution; (United States) 39:4. https://doi.org/10.2307/2408678

Fitchette, A.-C., Dinh, O.T., Faye, L., Bardor, M., 2007. Plant Proteomics and Glycosylation, in: Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C., Méchin, V. (Eds.), Plant Proteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 317–342. https://doi.org/10.1385/1-59745-227-0:317

Harris, E.H., 2009. The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use. Academic Press.

Hempel, F., Maier, U.G., 2016. Microalgae as Solar-Powered Protein Factories, in: Vega, M.C. (Ed.), Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 241–262. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27216-0_16

Jokel, M., Kosourov, S., Battchikova, N., Tsygankov, A.A., Aro, E.M., Allahverdiyeva, Y., 2015. Chlamydomonas Flavodiiron Proteins Facilitate Acclimation to Anoxia During Sulfur Deprivation. Plant Cell Physiol 56, 1598–1607. https://doi.org/10.1093/pcp/pcv085

Klutts, J.S., Levery, S.B., Doering, T.L., 2007. A β-1,2-Xylosyltransferase from Cryptococcus neoformans Defines a New Family of Glycosyltransferases. J. Biol. Chem. 282, 17890–17899. https://doi.org/10.1074/jbc.M701941200

Koprivova, A., Stemmer, C., Altmann, F., Hoffmann, A., Kopriva, S., Gorr, G., Reski, R., Decker, E.L., 2004. Targeted knockouts of Physcomitrella lacking plant-specific immunogenic N-glycans. Plant Biotechnology Journal 2, 517–523. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00100.x

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 33, 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Landry, N., Ward, B.J., Trépanier, S., Montomoli, E., Dargis, M., Lapini, G., Vézina, L.-P., 2010. Preclinical and Clinical Development of Plant-Made Virus-Like Particle Vaccine against Avian H5N1 Influenza. PLOS ONE 5, e15559. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015559

Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A.-C., Gomord, V., Faye, L., 1998. N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. Plant Molecular Biology 38, 31–48. https://doi.org/10.1023/A:1006012005654

Levy-Ontman, O., Arad, S. (Malis), Harvey, D.J., Parsons, T.B., Fairbanks, A., Tekoah, Y., 2011. Unique N-Glycan Moieties of the 66-kDa Cell Wall Glycoprotein from the Red Microalga Porphyridium sp. Journal of Biological Chemistry 286, 21340–21352. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.175042

Levy-Ontman, O., Fisher, M., Shotland, Y., Weinstein, Y., Tekoah, Y., Arad, S.M., 2014. Genes Involved in the Endoplasmic Reticulum N-Glycosylation Pathway of the Red Microalga

Porphyridium sp.: A Bioinformatic Study. International Journal of Molecular Sciences 15, 2305–2326. https://doi.org/10.3390/ijms15022305

Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S.S., Blum, S.R., Ivanova, N., Yue, R., Robertson, J.M., Lefebvre, P.A., Fitz-Gibbon, S.T., Grossman, A.R., Jonikas, M.C., 2016. An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in Chlamydomonas reinhardtii. The Plant Cell 28, 367–387. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00465

Lingg, N., Zhang, P., Song, Z., Bardor, M., 2012. The sweet tooth of biopharmaceuticals: Importance of recombinant protein glycosylation analysis. Biotechnology Journal 7, 1462–1472. https://doi.org/10.1002/biot.201200078

Lucas, P.-L., Dumontier, R., Loutelier-Bourhis, C., Mareck, A., Afonso, C., Lerouge, P., Mati-Baouche, N., Bardor, M., 2018. User-friendly extraction and multistage tandem mass spectrometry based analysis of lipid-linked oligosaccharides in microalgae. Plant Methods 14, 107. https://doi.org/10.1186/s13007-018-0374-8

Marshall, W.F., 2008. Chapter 1 Basal Bodies: Platforms for Building Cilia, in: Current Topics in Developmental Biology, Ciliary Function in Mammalian Development. Academic Press, pp. 1–22. https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00801-6

Mathieu-Rivet, E., Kiefer-Meyer, M.-C., Vanier, G., Ovide, C., Burel, C., Lerouge, P., Bardor, M., 2014. Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals. Frontiers in Plant Science 5. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00359

Mathieu-Rivet, E., Lerouge, P., Bardor, M., 2017. Chlamydomonas reinhardtii: Protein Glycosylation and Production of Biopharmaceuticals, in: Hippler, M. (Ed.), Chlamydomonas: Biotechnology and Biomedicine, Microbiology Monographs. Springer International Publishing, Cham, pp. 45–72. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66360-9_3

Mathieu-Rivet, E., Scholz, M., Arias, C., Dardelle, F., Schulze, S., Mauff, F.L., Teo, G., Hochmal, A.K., Blanco-Rivero, A., Loutelier-Bourhis, C., Kiefer-Meyer, M.-C., Fufezan, C., Burel, C., Lerouge, P., Martinez, F., Bardor, M., Hippler, M., 2013. Exploring the N-glycosylation Pathway in Chlamydomonas reinhardtii Unravels Novel Complex Structures. Molecular & Cellular Proteomics 12, 3160–3183. https://doi.org/10.1074/mcp.M113.028191

Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.-H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.-L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.-P., Riaño-Pachón, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.-J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler,

C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W.C.A., Otillar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., Grossman, A.R., 2007. The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. Science 318, 245–250. https://doi.org/10.1126/science.1143609

Mimura, Y., Katoh, T., Saldova, R., O'Flaherty, R., Izumi, T., Mimura-Kimura, Y., Utsunomiya, T., Mizukami, Y., Yamamoto, K., Matsumoto, T., Rudd, P.M., 2018. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. Protein Cell 9, 47–62. https://doi.org/10.1007/s13238-017-0433-3

Mócsai, R., Figl, R., Troschl, C., Strasser, R., Svehla, E., Windwarder, M., Thader, A., Altmann, F., 2019. N-glycans of the microalga Chlorella vulgaris are of the oligomannosidic type but highly methylated. Sci Rep 9. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36884-1

Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press.

North, S.J., Huang, H.-H., Sundaram, S., Jang-Lee, J., Etienne, A.T., Trollope, A., Chalabi, S., Dell, A., Stanley, P., Haslam, S.M., 2010. Glycomics Profiling of Chinese Hamster Ovary Cell Glycosylation Mutants Reveals N-Glycans of a Novel Size and Complexity. Journal of Biological Chemistry 285, 5759–5775. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068353

O'Neill, E., Kuhaudomlarp, S., Rejzek, M., Fangel, J., Alagesan, K., Kolarich, D., Willats, W., Field, R., O'Neill, E.C., Kuhaudomlarp, S., Rejzek, M., Fangel, J.U., Alagesan, K., Kolarich, D., Willats, W.G.T., Field, R.A., 2017. Exploring the Glycans of Euglena gracilis. Biology 6, 45. https://doi.org/10.3390/biology6040045

Pagny, S., Bouissonnie, F., Sarkar, M., Follet-Gueye, M.L., Driouich, A., Schachter, H., Faye, L., Gomord, V., 2003. Structural requirements for Arabidopsisβ1,2-xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. The Plant Journal 33, 189–203. https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2002.01604.x

Paulus, K.E., Mahler, V., Pabst, M., Kogel, K.-H., Altmann, F., Sonnewald, U., 2011. Silencing β1,2-xylosyltransferase in Transgenic Tomato Fruits Reveals xylose as Constitutive Component of Ige-Binding Epitopes. Front. Plant Sci. 2. https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00042

Plancot, B., Vanier, G., Maire, F., Bardor, M., Lerouge, P., Farrant, J.M., Moore, J., Driouich, A., Vicré-Gibouin, M., Afonso, C., Loutelier-Bourhis, C., 2014. Structural characterization of arabinoxylans from two African plant species Eragrostis nindensis and Eragrostis tef using various mass spectrometric methods. Rapid Commun Mass Spectrom 28, 908–916. https://doi.org/10.1002/rcm.6859

Prien, J.M., Ashline, D.J., Lapadula, A.J., Zhang, H., Reinhold, V.N., 2009. The High Mannose Glycans from Bovine Ribonuclease B Isomer Characterization by Ion Trap MS. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 20, 539–556. https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.11.012

Rasala, B.A., Mayfield, S.P., 2015. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. Photosynthesis

Research 123, 227–239. https://doi.org/10.1007/s11120-014-9994-7

Rini, J., Esko, J., Varki, A., 2009. Glycosyltransferases and Glycan-processing Enzymes, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Rochaix, J.-D., 2002. Chlamydomonas, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes. FEBS Letters 529, 34–38. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03181-2

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

Schähs, M., Strasser, R., Stadlmann, J., Kunert, R., Rademacher, T., Steinkellner, H., 2007. Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern. Plant Biotechnology Journal 5, 657–663. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00273.x

Schulze, S., Oltmanns, A., Machnik, N., Liu, G., Xu, N., Jarmatz, N., Scholz, M., Sugimoto, K., Fufezan, C., Huang, K., Hippler, M., 2018. N-Glycoproteomic Characterization of Mannosidase and Xylosyltransferase Mutant Strains of Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiology 176, 1952–1964. https://doi.org/10.1104/pp.17.01450

Schulze, S., Urzica, E., Reijnders, M.J.M.F., van de Geest, H., Warris, S., Bakker, L.V., Fufezan, C., Martins dos Santos, V.A.P., Schaap, P.J., Peters, S.A., Hippler, M., 2017. Identification of methylated GnTI-dependent N-glycans in Botryococcus brauni. New Phytologist 215, 1361–1369. https://doi.org/10.1111/nph.14713

Shin, Y.-J., Chong, Y.-J., Yang, M.-S., Kwon, T.-H., 2011. Production of recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor in rice cell suspension culture with a human-like N-glycan structure: Production of rhGM-CSF with a human-like N-glycan structure. Plant Biotechnology Journal 9, 1109–1119. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00636.x

Sizova, I., Fuhrmann, M., Hegemann, P., 2001. A Streptomyces rimosusaphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to Chlamydomonas reinhardtii. Gene 277, 221–229. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00616-3

Sourrouille, C., Marquet-Blouin, E., D'Aoust, M.-A., Kiefer-Meyer, M.-C., Seveno, M., Pagny-Salehabadi, S., Bardor, M., Durambur, G., Lerouge, P., Vezina, L., Gomord, V., 2008. Down-regulated expression of plant-specific glycoepitopes in alfalfa. Plant Biotechnology Journal 6, 702–721. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00353.x

Stanley, P., Taniguchi, N., Aebi, M., 2015. N-Glycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Strasser, R., 2016. Plant protein glycosylation. Glycobiology cww023. https://doi.org/10.1093/glycob/cww023

Strasser, R., Altmann, F., Mach, L., Glössl, J., Steinkellner, H., 2004. Generation of

Arabidopsis thaliana plants with complex N-glycans lacking β1,2-linked xylose and core α1,3-linked fucose. FEBS Letters 561, 132–136. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00150-4

Strasser, R., Mucha, J., Mach, L., Altmann, F., Wilson, I.B.H., Glössl, J., Steinkellner, H., 2000. Molecular cloning and functional expression of β1,2-xylosyltransferase cDNA from Arabidopsis thaliana 1. FEBS Letters 472, 105–108. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01443-5

Struwe, W.B., Pagel, K., Benesch, J.L.P., Harvey, D.J., Campbell, M.P., 2016. GlycoMob: an ion mobility-mass spectrometry collision cross section database for glycomics. Glycoconjugate Journal 33, 399–404. https://doi.org/10.1007/s10719-015-9613-7

Tandan, R., Hehir, M.K., Waheed, W., Howard, D.B., 2017. Rituximab treatment of myasthenia gravis: A systematic review. Muscle Nerve 56, 185–196. https://doi.org/10.1002/mus.25597

van Beers, M.M.C., Bardor, M., 2012. Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. Biotechnology Journal 7, 1473–1484. https://doi.org/10.1002/biot.201200065

Vanier, G., Lucas, P.-L., Loutelier-Bourhis, C., Vanier, J., Plasson, C., Walet-Balieu, M.-L., Tchi-Song, P.C., Remy-Jouet, I., Richard, V., Bernard, S., Driouich, A., Afonso, C., Lerouge, P., Mathieu-Rivet, E., Bardor, M., 2017. Heterologous expression of the N -acetylglucosaminyltransferase I dictates a reinvestigation of the N -glycosylation pathway in Chlamydomonas reinhardtii. Scientific Reports 7, 10156. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10698-z

Varki, A., 2017. Biological roles of glycans. Glycobiology 27, 3–49. https://doi.org/10.1093/glycob/cww086

Varki, A., Cummings, R.D., Aebi, M., Packer, N.H., Seeberger, P.H., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G., Darvill, A., Kinoshita, T., Prestegard, J.J., Schnaar, R.L., Freeze, H.H., Marth, J.D., Bertozzi, C.R., Etzler, M.E., Frank, M., Vliegenthart, J.F., Lütteke, T., Perez, S., Bolton, E., Rudd, P., Paulson, J., Kanehisa, M., Toukach, P., Aoki-Kinoshita, K.F., Dell, A., Narimatsu, H., York, W., Taniguchi, N., Kornfeld, S., 2015. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. Glycobiology 25, 1323–1324. https://doi.org/10.1093/glycob/cwv091

Walsh, G., 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. Nature Biotechnology 28, 917–924. https://doi.org/10.1038/nbt0910-917

Wang, P., Wang, H., Gai, J., Tian, X., Zhang, X., Lv, Y., Jian, Y., 2017. Evolution of protein N-glycosylation process in Golgi apparatus which shapes diversity of protein N-glycan structures in plants, animals and fungi. Sci Rep 7. https://doi.org/10.1038/srep40301

Ward, B.J., Landry, N., Trépanier, S., Mercier, G., Dargis, M., Couture, M., D'Aoust, M.-A., Vézina, L.-P., 2014. Human antibody response to N-glycans present on plant-made influenza virus-like particle (VLP) vaccines. Vaccine 32, 6098–6106. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.079

Wilson, I.B.H., Altmann, F., 1998. Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens: Core α1,3-linked fucose and xylose present in all pollens examined. Glycoconj J 15, 1055–1070. https://doi.org/10.1023/A:1006960401562

Zhang, P., Burel, C., Plasson, C., Kiefer-Meyer, M.-C., Ovide, C., Gugi, B., Wan, C., Teo, G., Mak, A., Song, Z., Driouich, A., Lerouge, P., Bardor, M., 2019. Characterization of a GDP-Fucose transporter and a fucosyltransferase involved in the fucosylation of glycoproteins in the diatom Phaeodactylum tricornutum. Front. Plant Sci. 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00610

Zhang, R., Patena, W., Armbruster, U., Gang, S.S., Blum, S.R., Jonikas, M.C., 2014. High-Throughput Genotyping of Green Algal Mutants Reveals Random Distribution of Mutagenic Insertion Sites and Endonucleolytic Cleavage of Transforming DNA. The Plant Cell Online 26, 1398–1409. https://doi.org/10.1105/tpc.114.124099

Zhu, F., Lee, S., Valentine, S.J., Reilly, J.P., Clemmer, D.E., 2012. Mannose7 Glycan Isomer Characterization by IMS-MS/MS Analysis. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23, 2158–2166. https://doi.org/10.1007/s13361-012-0491-y

Figures supplémentaires du chapitre III

Supporting Information

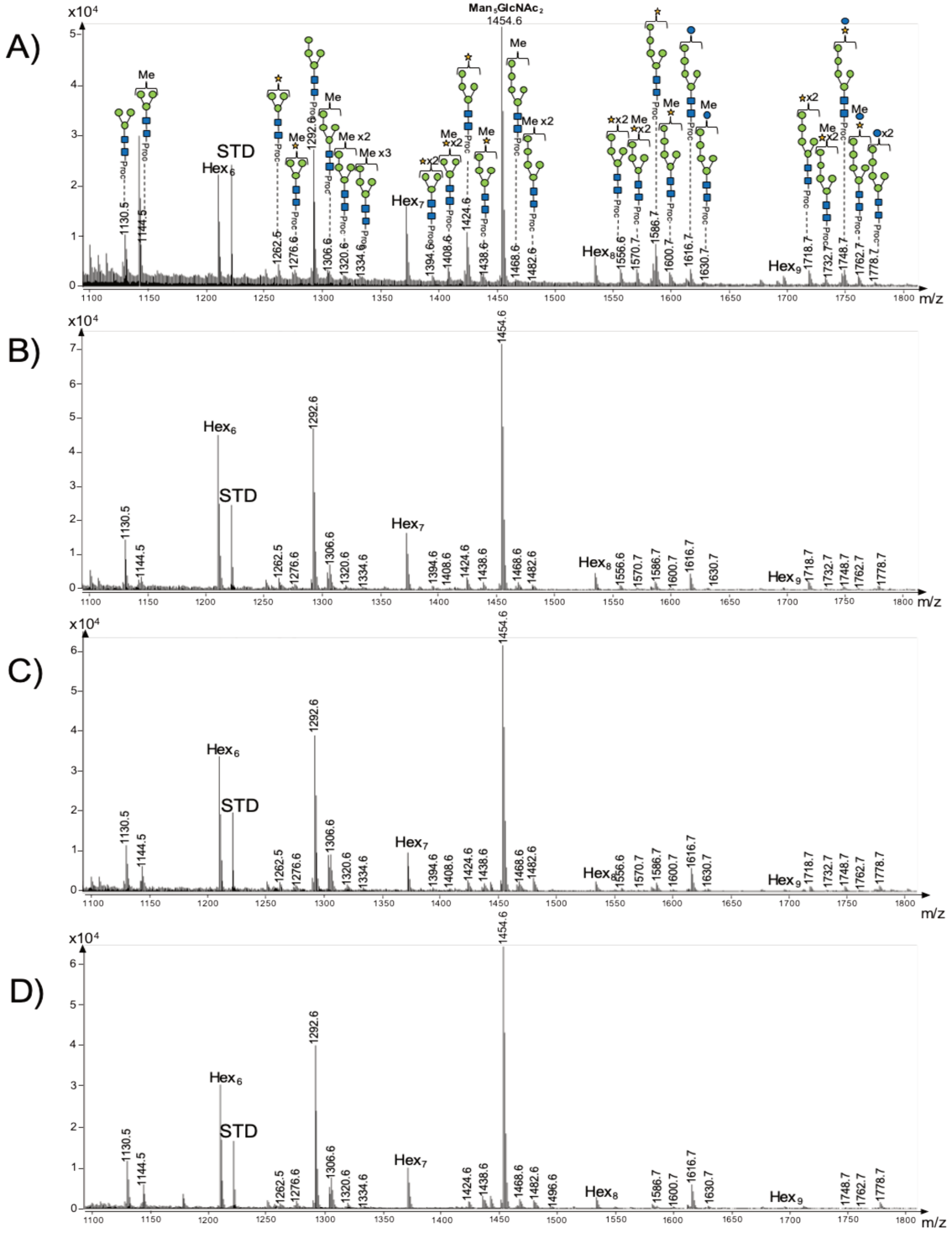
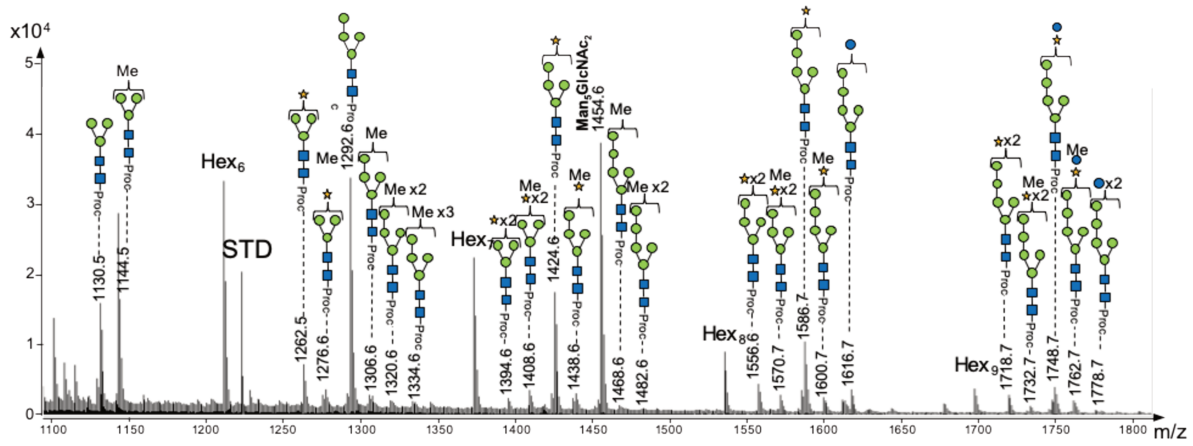


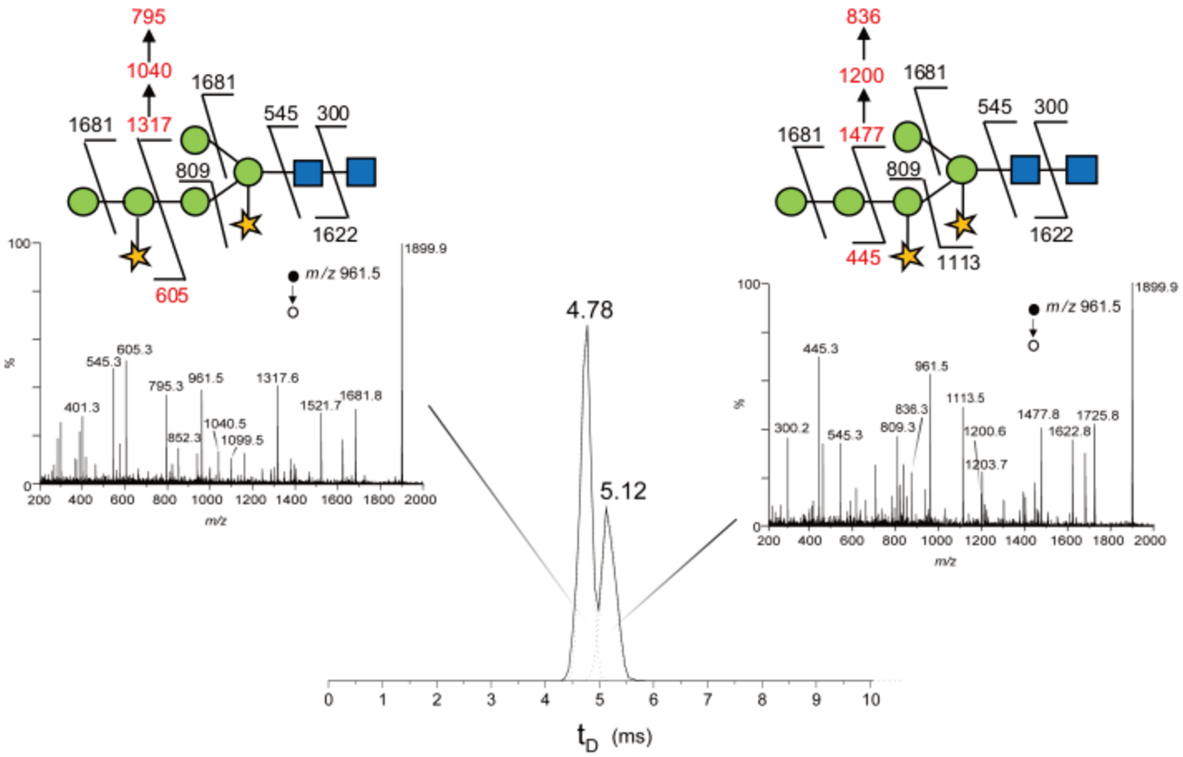
Figure S1: NanoLC-ESI-MS analysis of procainamide labeled *N*-glycans isolated from total protein extracts of *C. reinhardtii* WT and mutant lines revealed a decreased of xylosylation level in the mutants.

A) WT (CC-5325 (mt-)) spectrum. B) IM_{XTA} spectrum. C) IM_{XTB} spectrum. D) IM_{XTA}xIM_{XTB} spectrum. Blue square: *N*-acetylglucosamine; green circle: mannose, orange star: xylose, blue circle: glucose, Me: methyl group, Hex: hexose polymer, STD: internal standard, Proc: procainamide.



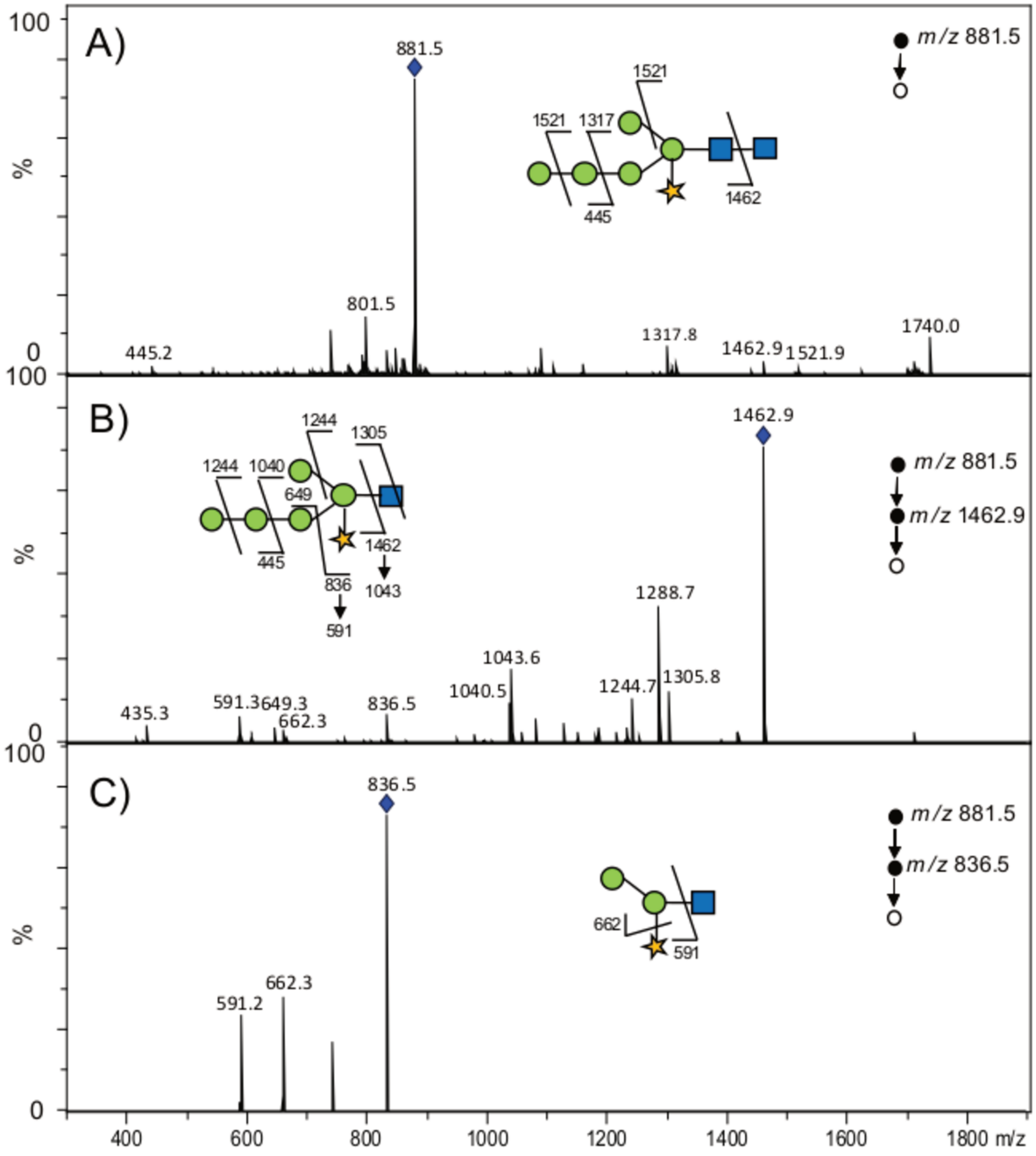
<u>Figure S2:</u> NanoLC-ESI-MS analysis of procainamide labeled *N*-glycans isolataed from total protein extracts of *C. reinhardtii* CC-5155 (mt+) revealed a similar glycosylation pattern as the one obtained for the CC-5325 (mt-).

The spectrum of the CC-5155 (mt+) strain used as an intermediate for the genetic crossing in order to generate the double mutant is presented. Blue square: *N*-acetylglucosamine; green circle: mannose, orange star: xylose, blue circle: glucose, Me: methyl group, Hex: hexose polymer, STD: internal standard, Proc: procainamide.



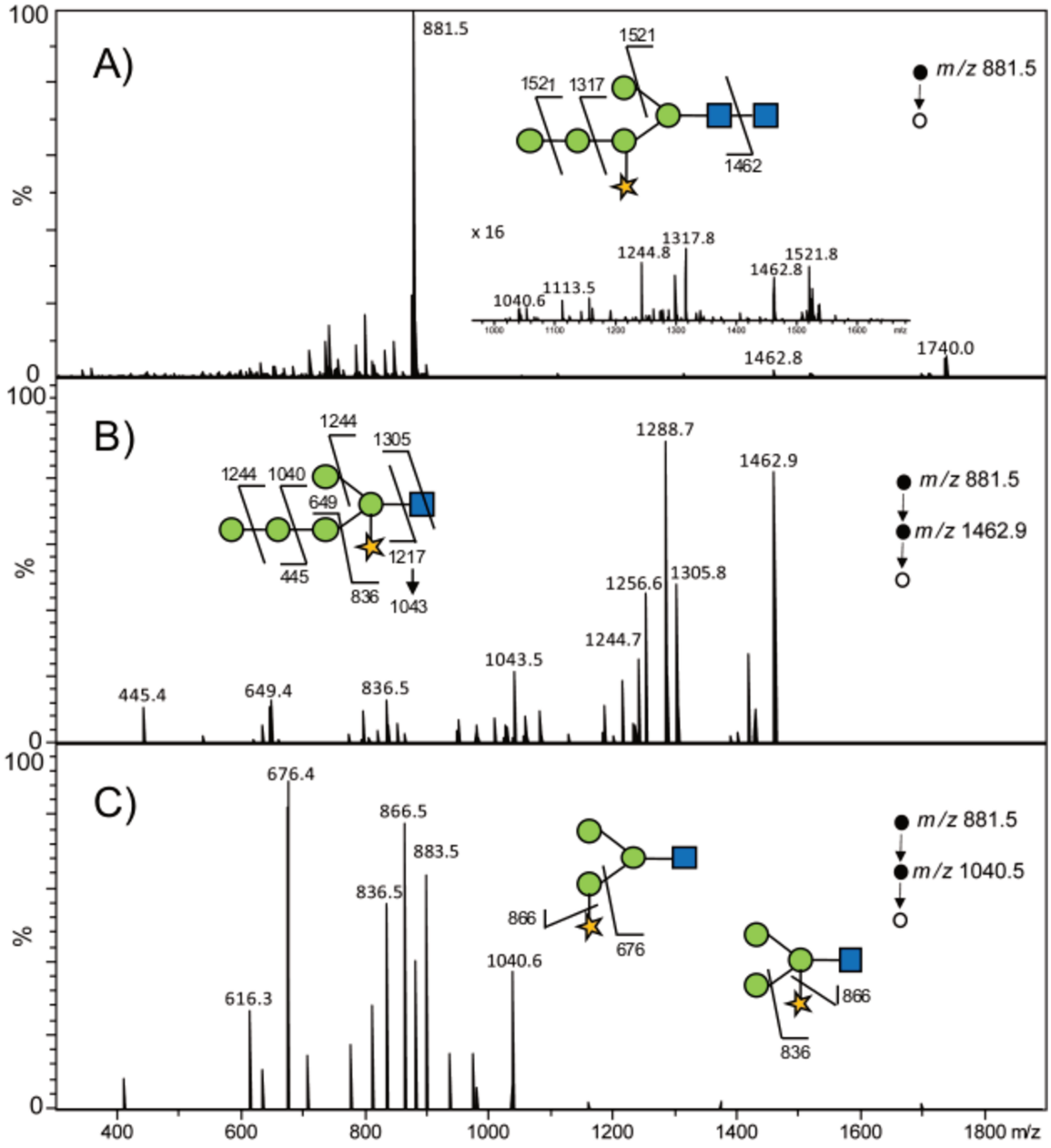
<u>Figure S3:</u> The dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ *N*-glycan from the IM_{XTB} mutant presents two isomers, which are identical to the ones described for the WT.

IMS-MS^2 data of permethylated dixylosylated $Man_5GlcNAc_2$ from *C. reinhardtii* IM_{XTB} mutant using selection of precursor ion *m/z* 961.5 ($[M+2Na]^{2+}$) with the quadrupole and collision in the transfer cell (140 eV collision energy). The ion mobility spectrum shows the presence of two isomers which have been identified by its specific MS^2 spectrum. t_D: drift time expressed in millisecond (ms).



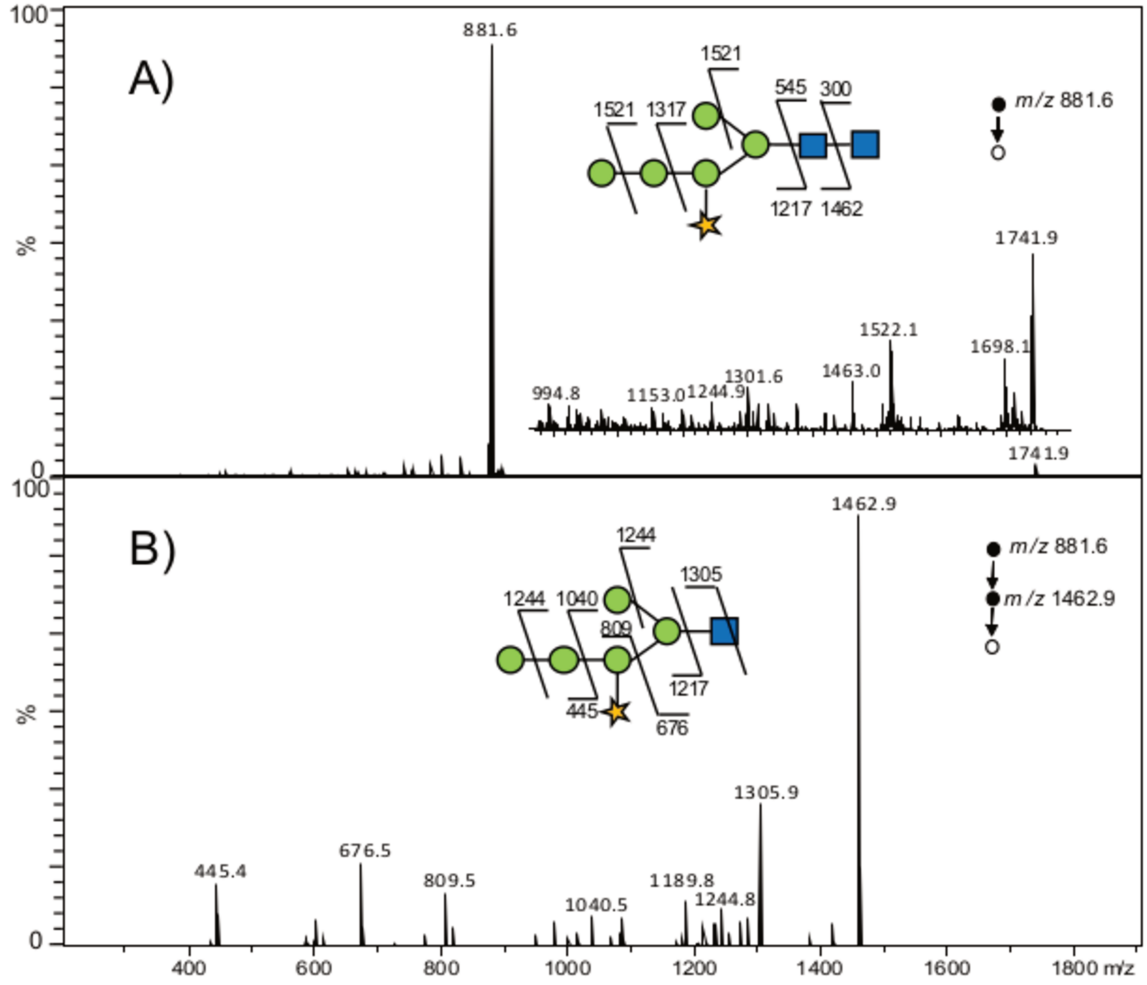
<u>Figure S4:</u> The ESI-MS^n of the monoxylosylated structure of the IM$_{XTB}$ mutant confirmed the structure identified by IMS-MS^2.

ESI-MS^n spectra with n=2 selecting *m/z* 881.5 ([M+2Na]$^{2+}$) as the precursor ion (panel A), n=3 selecting *m/z* 1462.5 as intermediate ion (panel B) and n=3 with *m/z* 836.5 as intermediate ion (panel C) of permethylated monoxylosylated $Man_5GlcNAc_2$ from IM$_{XTB}$ sample. On each panel, the ion selected for the fragmentation analysis is indicated and its fragmentation pattern is proposed according to Prien *et al.*, 2009. Blue square: *N*-acetylglucosamine; green circle: mannose, orange star: xylose. Cleavages of the glycosylic bond and cross ring cleavages are represented by lines.



<u>Figure S5</u>: ESI-MS^n analysis of IM$_{XTA}$ mutant confirmed the heterogenous positions of the xylose residue in the monoxylosylated Man$_5$GlcNAc$_2$ *N*-glycan.

ESI-MS^n spectra with n=2 selecting *m/z* 881.5 ([M+2Na]$^{2+}$) as the precursor ion (panel A), n=3 selecting *m/z* 1462.5 as intermediate ion (panel B) and n=3 with *m/z* 1040.5 as intermediate ion (panel C) of permethylated monoxylosylated Man$_5$GlcNAc$_2$ from IM$_{XTA}$ sample. On each panel, the ion selected for the fragmentation analysis is indicated and its fragmentation pattern is proposed according to Prien *et al.*, 2009. Blue square: *N*-acetylglucosamine; green circle: mannose, orange star: xylose. Cleavages of the glycosylic bond and cross ring cleavages are represented by lines.



<u>Figure S6:</u> The ESI-MS^n analysis of the monoxylosylated structure of the IM$_{XTA}$xIM$_{XTB}$ double mutant confirmed the structure identified by IMS-MS^2.

ESI-MS^n spectra with n=2 selecting *m/z* 881.5 ([M+2Na]$^{2+}$) as the precursor ion (panel A) and n=3 selecting *m/z* 1462.5 as intermediate ion (panel B) of permethylated monoxylosylated $Man_5GlcNAc_2$ isolated from the IM$_{XTA}$xIM$_{XTB}$ double mutant. On each panel, the ion selected for the fragmentation is indicated and its fragmentation pattern is proposed according to Prien *et al.*, 2009. Blue square: *N*-acetylglucosamine; green circle: mannose, orange star: xylose. Cleavages of the glycosylic bond and cross ring cleavages are represented by lines.

Supporting Table S1: List of primers used.

Summary of the specific primers used for amplification of genomic DNA and cDNA in the different mutants (IM_{XTA}, IM_{XTB}, IM_{XTA}xIM_{XTB}) and WT of *C. reinhardtii* lines.

Name	Sequence	Target	Amplification size	Hybridation temperature (C°)
CBLP For	CTTCTCGCCCATGACCAC	*CBLP*	254bp (gDNA))	60
CBLP Rev	CCCACCAGGTTCAG		104bp (cDNA)	
XTA For	GCCTCGCTACCTCAAAAGTG	*XTA*	1147bp	60
XTA Rev	GGAAGTCAGTCGAGTCCAGC			
XTB For	ACACTGCCTTGAGAGGGAGA	*XTB*	1716bp	60
XTB Rev	GCTAACTGTGCTCGTCCTCC			
OMJ282	ATGCTTCTCTGCATCCGTCT	Locus control	1315bp	58
OMJ284	ATGTTTTACGTCCAGTCCGC			
XTAEX8 For	CGAGGTGCTGCACAACAG	*XTA*	211bp (cDNA)	60
XTAEX9 Rev	GGTACCGCGTGACCAGGC			
XTBEX4 For	TTGACTTCTGGCTGGCTGAG	*XTB*	274bp (cDNA)	60
XTBEX4 Rev	ATTGACGTGTTCCCGGTCAA			

<u>Supporting Table S2:</u> Relative proportion of procainamide labeled *N*-glycan extracts from CC-5325 used as a WT, IM$_{XTA}$, IM$_{XTB}$ and IM$_{XTA}$xIM$_{XTB}$ mutants.

The relative percentage has been calculated based on the ion intensities obtained by nanoLC-ESI-MS. This analysis has been performed on three independent biological preparations. A) Relative proportion of *N*-glycans bearing no xylose. B) Relative proportion of monoxylosylated *N*-glycans. C) Relative proportion of dixylosylated *N*-glycans. M: mannose, GN: GlcNAc, G: glucose, X: xylose, m: methyl group.

A)

Without xyloses													
Structure	Mass(m/z)	5325			IM$_{XTA}$			IM$_{XTB}$			IM$_{XTA}$ x IM$_{XTB}$		
M3GN2	1130.5081	5.24%	7.43%	5.76%	7.91%	10.10%	9.09%	6.74%	1.59%	6.22%	7.59%	7.51%	11.34%
M3GN2m1	1144.5237	4.24%	1.00%	0.79%	2.08%	0.39%	0.00%	3.75%	0.00%	0.82%	3.84%	1.45%	2.29%
M3GN2m2	1158.5394	1.64%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.70%	0.00%	0.00%	0.61%	0.00%	0.00%
M3GN2m3	1172.555	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M4GN2	1292.5609	13.87%	24.22%	20.89%	25.26%	34.95%	26.83%	22.70%	29.69%	22.30%	25.67%	41.79%	27.42%
M4GN2m1	1306.5765	1.58%	1.27%	1.36%	4.03%	4.42%	2.08%	5.50%	0.72%	1.34%	4.88%	5.42%	3.42%
M4GN2m2	1320.5922	1.01%	0.16%	0.93%	0.75%	0.31%	0.89%	1.01%	0.05%	0.56%	1.01%	0.30%	1.35%
M4GN2m3	1334.6078	1.01%	0.00%	1.14%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.46%	0.17%	0.00%
M5GN2	1454.6137	26.35%	28.02%	34.03%	38.50%	29.58%	42.36%	35.77%	52.12%	41.54%	41.26%	31.08%	40.98%
M5GN2m1	1468.6294	0.62%	0.33%	0.62%	1.23%	1.28%	0.84%	1.48%	0.51%	0.74%	1.59%	2.11%	1.76%
M5GN2m2	1482.645	0.53%	0.23%	0.58%	0.63%	0.24%	0.00%	1.08%	0.00%	0.54%	0.96%	0.34%	0.59%
M5GN2m3	1496.6607	0.36%	0.00%	0.67%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G1	1616.6665	1.75%	1.19%	2.02%	2.60%	1.92%	3.19%	3.49%	2.24%	2.51%	3.82%	2.62%	4.68%
M5GN2G1m1	1630.6822	0.00%	0.09%	0.00%	0.30%	0.20%	0.00%	0.44%	0.09%	0.00%	0.49%	0.37%	0.00%
M5GN2G1m2	1644.6978	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.20%	0.14%	0.00%
M5GN2G1m3	1658.7135	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.11%	0.00%
M5GN2G2	1778.7194	0.26%	0.16%	0.23%	0.64%	0.38%	0.62%	0.84%	0.27%	0.28%	1.03%	0.53%	1.12%
M5GN2G2m1	1792.735	0.11%	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.00%	0.14%	0.07%	0.00%	0.19%	0.15%	0.00%
M5GN2G2m2	1806.7507	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.09%	0.04%	0.00%	0.11%	0.14%	0.00%
M5GN2G2m3	1820.7663	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.11%	0.00%
M5GN2G3	1940.7722	0.00%	0.00%	0.00%	0.12%	0.00%	0.00%	0.17%	0.07%	0.00%	0.23%	0.11%	0.00%
M5GN2G3m1	1954.7878	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3m2	1968.8035	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3m3	1982.8191	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Total		58.57%	64.10%	69.04%	84.04%	83.94%	85.90%	83.90%	87.54%	76.85%	93.93%	94.46%	94.96%
Mean		63.90%			84.63%			82.76%			94.45%		
Standard Deviation		5.24%			1.10%			5.44%			0.52%		

B)

One xylose													
Structure	**Mass(m/z)**	**5325**			**IM*XTA***			**IM*XTB***			**IM*XTA* x IM*XTB***		
M3GN2X1	**1262.5503**	2.24%	1.27%	2.56%	1.86%	1.01%	2.03%	1.40%	0.43%	1.50%	0.92%	0.56%	1.34%
M3GN2X1m1	**1276.566**	1.70%	0.93%	1.13%	0.99%	0.54%	0.72%	1.00%	0.21%	1.20%	1.32%	0.44%	1.93%
M3GN2X1m2	**1290.5816**	1.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.21%	0.00%	0.00%	0.27%	0.00%
M3GN2X1m3	**1304.5973**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M4GN2X1	**1424.6031**	5.48%	7.02%	3.94%	2.02%	1.52%	1.68%	1.70%	1.16%	1.24%	1.18%	0.57%	0.70%
M4GN2X1m1	**1438.6188**	1.33%	0.56%	0.60%	1.24%	0.87%	0.85%	1.20%	0.24%	0.61%	0.00%	0.82%	1.02%
M4GN2X1m2	**1452.6344**	1.15%	0.00%	0.37%	1.08%	0.54%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.34%	0.00%
M4GN2X1m3	**1466.6501**	0.74%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.12%	0.00%
M5GN2X1	**1586.656**	4.34%	6.89%	4.32%	1.35%	3.19%	2.80%	1.30%	3.16%	3.87%	0.45%	0.37%	0.00%
M5GN2X1m1	**1600.6716**	0.92%	0.46%	0.55%	0.18%	0.20%	0.00%	0.40%	0.00%	0.00%	0.38%	0.25%	0.00%
M5GN2X1m2	**1614.6873**	0.00%	0.10%	0.43%	0.23%	0.05%	0.00%	0.40%	0.03%	0.00%	0.19%	0.00%	0.00%
M5GN2X1m3	**1628.7029**	0.00%	0.09%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.30%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G1X1	**1748.7088**	1.68%	1.63%	1.60%	0.61%	0.89%	0.95%	0.80%	1.12%	1.43%	0.22%	0.22%	0.00%
M5GN2G1X1m1	**1762.7244**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.20%	0.05%	0.00%	0.16%	0.17%	0.00%
M5GN2G1X1m2	**1776.7401**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.30%	0.03%	0.00%	0.19%	0.00%	0.00%
M5GN2G1X1m3	**1790.7557**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.20%	0.00%	0.00%	0.00%	0.06%	0.00%
M5GN2G2X1	**1910.7616**	0.64%	0.53%	0.99%	0.30%	0.28%	0.32%	0.40%	0.44%	0.70%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G2X1m1	**1924.7773**	0.00%	0.00%	0.09%	0.00%	0.06%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G2X1m2	**1938.7929**	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.03%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.06%	0.00%
M5GN2G2X1m3	**1952.8086**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3X1	**2072.8144**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.12%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3X1m1	**2086.8301**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3X1m2	**2100.8757**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3X1m3	**2114.8614**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Total		22.13%	19.50%	16.58%	9.90%	9.19%	9.35%	10.50%	7.20%	10.67%	5.00%	4.26%	4.98%
Mean		19.40%			9.48%			9.46%			4.75%		
Standard Deviation		2.78%			0.37%			1.96%			0.42%		

C)

Two xyloses													
Structure	**Mass(m/z)**	**5325**			**IM*XTA***			**IM*XTB***			**IM*XTA* x IM*XTB***		
M3GN2X2	**1394.5926**	1.15%	1.58%	0.98%	0.65%	0.27%	0.57%	0.57%	0.00%	1.26%	0.16%	0.06%	0.00%
M3GN2X2m1	**1408.6082**	1.92%	1.88%	1.64%	0.23%	0.18%	0.68%	0.40%	0.24%	1.89%	0.27%	0.00%	0.00%
M3GN2X2m2	**1422.6239**	1.63%	1.40%	1.69%	0.00%	0.00%	0.00%	0.45%	0.20%	1.11%	0.00%	0.00%	0.00%
M3GN2X2m3	**1436.6395**	1.31%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.71%	0.00%	0.00%	0.00%	0.53%	0.00%
M4GN2X2	**1556.6454**	1.75%	1.30%	1.58%	0.74%	0.68%	0.58%	0.56%	0.29%	1.22%	0.07%	0.04%	0.00%
M4GN2X2m1	**1570.661**	1.75%	1.79%	1.08%	0.37%	0.42%	0.00%	0.26%	0.72%	1.28%	0.14%	0.11%	0.00%
M4GN2X2m2	**1584.6767**	2.29%	2.49%	2.01%	0.39%	0.25%	0.00%	0.00%	0.99%	1.51%	0.00%	0.00%	0.00%
M4GN2X2m3	**1598.6923**	1.46%	0.46%	0.53%	0.27%	0.10%	0.00%	0.27%	0.08%	0.46%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2X2	**1718.6982**	1.61%	1.91%	1.69%	1.40%	2.92%	1.68%	0.78%	0.39%	1.43%	0.07%	0.00%	0.05%
M5GN2X2m1	**1732.7139**	0.85%	0.57%	0.54%	0.29%	0.31%	0.15%	0.29%	0.51%	0.49%	0.09%	0.08%	0.00%
M5GN2X2m2	**1746.7295**	1.34%	1.43%	0.95%	0.20%	0.19%	0.00%	0.20%	1.00%	0.77%	0.09%	0.18%	0.00%
M5GN2X2m3	**1760.7452**	1.04%	0.37%	0.32%	0.32%	0.10%	0.00%	0.30%	0.03%	0.00%	0.12%	0.12%	0.00%
M5GN2G1X2	**1880.751**	0.60%	0.70%	1.02%	0.67%	0.87%	0.80%	0.51%	0.47%	0.89%	0.06%	0.00%	0.00%
M5GN2G1X2m1	**1894.7667**	0.25%	0.17%	0.00%	0.09%	0.13%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G1X2m2	**1908.7823**	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.07%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.08%	0.00%
M5GN2G1X2m3	**1922.798**	0.00%	0.16%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G2X2	**2042.8039**	0.22%	0.18%	0.26%	0.30%	0.24%	0.29%	0.25%	0.19%	0.18%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G2X2m1	**2056.8195**	0.13%	0.00%	0.00%	0.06%	0.15%	0.00%	0.07%	0.04%	0.00%	0.00%	0.07%	0.00%
M5GN2G2X2m2	**2070.8352**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G2X2m3	**2084.8508**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3X2	**2204.8567**	0.00%	0.00%	0.09%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3X2m1	**2218.8723**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3X2m2	**2232.888**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
M5GN2G3X2m3	**2246.9036**	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Total		19.30%	16.40%	14.38%	6.05%	6.88%	4.75%	5.63%	5.26%	12.48%	1.07%	1.28%	0.05%
Mean		16.69%			5.89%			7.79%			0.80%		
Standard Deviation		2.47%			1.07%			4.07%			0.66%		

Matériels et Méthodes

I) Matériel biologique

Au cours de ces travaux, deux espèces de microalgues nommées *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornutum* ont été utilisées afin d'étudier leur processus de *N*-glycosylation. Deux souches thermocompétentes de la bactérie *Escherichia coli*, DH5alpha et Pir1, ont également été utilisées afin d'effectuer les différentes étapes de sous-clonage plasmidique.

A) *Chlamydomonas reinhardtii*

1) Souches sauvages

a) CC-503 cw92 mt+

La souche CC-503 cw92 mt+ est isolée du fond génétique CC-125 mt+ (137c) (Hyams and Davies, 1972; Voigt et al., 1997). Cette souche est classée parmi les cellules déficientes en paroi (*cell wall less*), autrement dit, avec une absence de paroi ou forte altération de la paroi en comparaison avec la souche sauvage CC-125 mt+ (137c).

b) CC-5325 (CC-4533) cw15 mt-

Cette souche haploïde est issue du croisement entre les souches 4A- (Dent et al., 2005) et D66+ (Schnell and Lefebvre, 1993). Elle a été sélectionnée pour plusieurs raisons : sa capacité à supporter la cryopréservation, sa capacité à être transformée par électroporation, sa facilité de croisement, sa capacité à être cultivée à l'obscurité ou à la lumière sans faire d'agrégat en culture liquide, sa capacité de nage normale et enfin sa capacité à ne pas adhérer sur le verre. De plus, il est à noter que ce fond génétique a été utilisé pour la construction de la banque de mutants d'insertion CLiP (Chlamydomonas Library Project (www.chlamylibrary.org)) et est identique au fond génétique CC-4533 cw15 mt- [Jonikas CMJ030].

c) CC-5155 cw15 mt+

La souche CC-5155 cw15 mt+ est issue du croisement de la souche CC-4533 cw15 mt- [Jonikas CMJ030] avec la souche CC-125 mt+ [137c] dont les tétrades mt+ ont été conservées et croisées de nouveau cinq fois avec le fond génétique CC-4533 afin d'obtenir une souche mt+ se rapprochant le plus possible du fond génétique initial.

2) Mutants :

Tous les mutants de *C. reinhardtii* utilisés au cours de cette thèse proviennent de la banque de mutants CLiP (https://www.chlamylibrary.org). La banque de mutants a été générée en insérant la cassette CIB1 de manière aléatoire par électroporation. Cette cassette CIB1 est une cassette d'ADN double brin conférant une résistance à la paromomycine chez *C. reinhardtii* sur le fond génétique de référence CC-5325 cw15 mt-. Cette banque de mutants recense plus de 60 000 mutants d'insertion disponibles pour la communauté scientifique.

a) Mutant XTA (LMJ.RY0402.087519)

La souche mutante a été obtenue par insertion de la cassette de résistance à la paromomycine CIB1 dans l'Exon 1 du gène Cre09.g391282 codant pour une xylosyltransférase putative de *C. reinhardtii* (XTA)**(*Figure 19*)**.



Figure 19 : Schéma d'insertion de la cassette CIB1 sur le gène Cre09.g391282 du mutant IM_{XTA} (LMJ.RY0402.087519).

b) Mutant XTB (LMJ.RY0402.118417)

La souche mutante a été obtenue par insertion de la cassette CIB1 dans l'Exon 1 du gène Cre16.g678997 codant pour une xylosyltransférase putative de *C. reinhardtii* (XTB)**(*Figure 20*)**.



Figure 20 : Schéma d'insertion de la cassette CIB1 sur le gène Cre16.g678997 du mutant IM_{XTB} (LMJ.RY0402.118417).

B) *Phaeodactylum tricornutum*

1) Pt1.8.6 (CCAP1055/1)

La souche de *P. tricornutum* utilisée dans cette thèse est la souche sauvage P.t1.8.6 (Bowler et al., 2008) initialement fournie par le laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie des Algues (PBA) de l'IFREMER de Nantes.

C) Souches bactériennes

1) DH5alpha

DH5alpha (MAX Efficiency™ DH5α Competent Cells, Invitrogen™) est une souche d'*Escherichia coli* thermocompétente très utilisée pour les opérations de clonage.

2) PIR1

Pir1 (One Shot™ PIR1 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen™) est une souche de bactérie thermocompétente utilisée dans le clonage de vecteur plasmidique possédant l'origine de réplication R6Kγ.

II) Cultures cellulaires

A) Culture cellulaire de microalgues

1) *C. reinhardtii*

Les souches de *C. reinhardtii* ont été mises en culture en batch dans des volumes de 20 mL, 200 mL et 1 L de milieu Tris Acétate Phosphate (TAP), autoclavé pendant 20 min à 120°C, 1 bar, dont la composition est détaillée dans le **Tableau 6**. Ce milieu de culture a la particularité de contenir une source de carbone directement assimilable, sous forme d'acétate, permettant une croissance plus rapide des cellules en éclairage continu.

Les cultures ont été effectuées pendant 4 jours sous une température constante de 23°C, avec une intensité lumineuse de 150 µmol(photon).m^{-2}.s^{-2} en lumière continue, fournie par une lampe fluorescente (TDL 150W, Philips, Eindhoven, the Neitherlands) et sous une agitation constante de 150 rpm. A terme, la densité cellulaire obtenue était de l'ordre de $2x10^7$ cellules.mL^{-1}.

Tableau 6 : Composition détaillée du milieu Tris Acétate Phosphate (TAP)

TAP (1X) 1 L	
Produit	Quantité
Tris base	2,42 g
Beijerink	25 mL
Éléments trace	1 mL
Acide acétique	1 mL
Tampon phosphate	0,375 mL
H_2O	Qsp 1 L

Beijerink (40X) 1 L		Éléments trace(200X) 1 L	
Produit	Quantité	Produit	Quantité
NH_4Cl	16 g	Na_2EDTA	50 g
$CaCl_2$, $2H_20$	2 g	$ZnSO_4$, 7H2O	22 g
$MgSO_4$ $7H_2O$	4 g	H_3BO_3	11,4 g
H_20	Qsp 1 L	$MnCl_2$, $4H_2O$	5,06 g
Tampon phosphate 100 mL		$CoCl_2$, $6H_2O$	1,61 g
Produit	Quantité	$CuSO_4$, $5H_2O$	1,57 g
K_2HPO_4	16 g	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$,$4H_20$	1,10 g
KH_2PO_4	4 g	$FeSO_4$,$7H_2O$	4,99 g
H_20	Qsp 100 mL	H_20	Qsp 1 L

2) *P. tricornutum*

La souche *P.t.* 1.8.6 (CCAP1055/1) a été cultivée en batch dans du milieu nutritif constitué d'eau de mer à 100%, stérilisé par filtration (0,22 µm) puis autoclavé pendant 20 min à 120°C, 1 bar. Ce milieu a été complémenté avec du milieu Conway et du silicate de sodium **(*Tableau 7*)**. Les diatomées ont été cultivées à 19°C dans 1L sous une photopériode

16h lumière/8h obscurité à 280-350 µmol(photons).$m^{-2}.s^{-1}$ et sous agitation à 100 rpm, pendant 10 jours. A terme, la densité cellulaire obtenue était proche de $1x10^7$ cellules.mL^{-1} .

Tableau 7 : Composition détaillée du milieu eau de mer 100%

Milieu 100% 1L		Conway (1051 mL)	
Produit	Quantité	Produit	Quantité
NaCl	33,3 g	Na_2EDTA	45 g
Conway	1 mL	$NaNO_3$	100 g
Na_2O_3Si (40 g.L^{-1})	2 mL	H_3BO_3	33,6 g
H_2O	Qsp 1 L	NaH_2PO_4	26 g
		$MnCl_2$	0,36 g
		$FeCl_3$	1,28 g
		H_20	1 L
		$ZnCl_2$	0,021 g
		$CoCl_2$	0,02 g
		$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0,009 g
		$CuSO_4$	0,02 g
		H_20	1 mL
		Vitamine B1 thiamine chlorhydrate	0,1 g
		Vitamine B12 cyanocobalamine	0,005 g
		H_20	50 mL

B) Culture cellulaire de bactéries

Les souches bactériennes utilisées ont été cultivées dans du milieu Lysogeny Broth (20 g de LB (LB Broth, Duchefa Biochimie) dans 1 L d'eau milliQ) pendant une nuit à 37°C sous une agitation continue à 150 rpm.

Les souches bactériennes cultivées sur boite de Petri ont été déposées avec une anse de platine sur dans du milieu Lysogeny Broth Agar (20 g de LB broth with agar (Sigma L-2897) dans 1 L d'eau milliQ).

C) Croisement génétique de souches chez *C. reinhardtii*

C. reinhardtii est une microalgue dotée de deux modes de reproduction : asexué et sexué. En condition normale la voie asexuée est privilégiée mais, en condition de stress comme par exemple une carence nutritive en azote, cette dernière privilégie la voie sexuée et se différencie en gamètes de polarités différentes (mt- et mt+) **(*Figure 21*)**.

Au cours de cette thèse, la souche IM_{XTB} (mt-) a été croisée avec la souche sauvage CC-5155 (mt+) afin de générer des souches mutantes IM_{XTB} (mt+). La souche mutante IM_{XTA} (mt-) a été croisée par la suite avec IM_{XTB} (mt+) afin de générer des doubles mutants IM_{XTA}xIM_{XTB}.

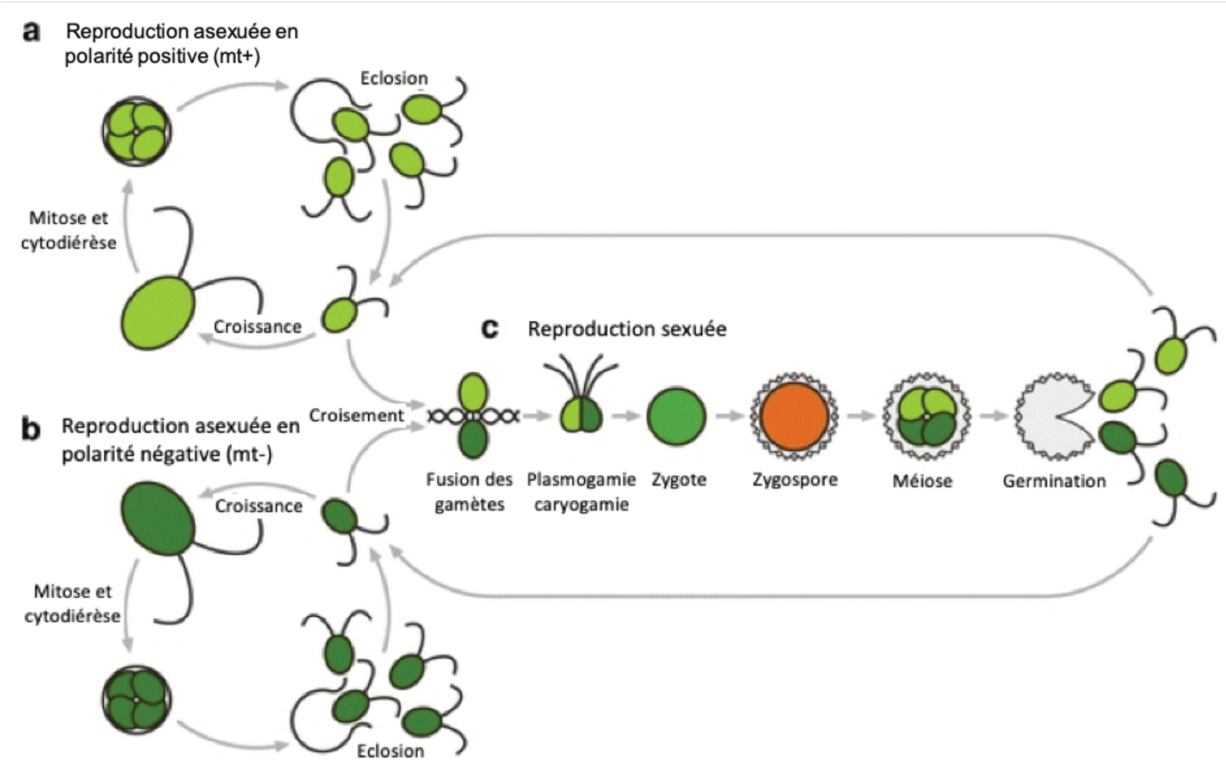


Figure 21 : Illustration de la reproduction sexuée et asexuée chez la microalgue C. reinhardtii.

a) Cycle de reproduction asexuée chez les souches mt+. b) Cycle de reproduction asexuée chez les souches mt-. c) Cycle de reproduction sexuée entre les souches mt+ et mt-.

1) Croisement

Les souches (mt+) et (mt-) ont été préalablement repiquées sur des boîtes de TAP contenant 1,5 % d'agar (Plant Agar, Duchefa Biochimie) et ont été incubées sous lumière continue à 23°C pendant 3 jours.

Après 3 jours, les cellules ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu TAP N10 agar. Ce milieu est composé d'une formulation identique au milieu TAP, cependant,

l'apport du Beijerink est remplacé par le Beijerink N10 (***Tableau 8***) 1,5%. Ce milieu agar déficient en nitrate va induire la différenciation des cellules en gamètes.

Tableau 8 : Formulation du Beijerink N10

Beijerink N10 (40X) 1 L	
Produit	Quantité
NH_4Cl	1,6 g
$CaCl_2,2H_20$	2 g
$MgSO_4,7H_20$	4 g
H_20	Compléter à 1 L

Après 3-4 jours, les souches mises en culture en milieu gélosé TAP N10, ont légèrement jaunies. Les cellules ont été grattées avec une anse de platine, et chacune a été inoculée dans 2 mL d'eau milliQ stérile (inoculation de manière à avoir de l'eau légèrement jaune) dans des tubes Falcon de 15 mL, puis, les tubes ont été incubés sous lumière continue (60 µmol(photon).m^{-2}.s^{-2}) et sous agitation (150 rpm) à 23°C pendant environ 30 min. Suite à cela, les tubes contenant les souches à croiser ont été mélangés au sein d'un même tube Falcon de 15 mL afin d'être placés par la suite en chambre de culture sous lumière continue à 23°C (sans agitation) pendant 6 h. Cette étape permet l'appariement entre les cellules mt+ et mt-.

Après 6 h d'incubation, les mélanges (1 mL) ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant du TAP agar à 4%. Les tétrades ont été reprises délicatement avec une pipette et ont été déposées en 4 points sur chaque boîte. Ces boîtes ont été ensuite laissées ouvertes, sous la hotte, pour un séchage de quelques heures avant d'être replacées dans la chambre de culture. Après une nuit (12 h) en chambre de culture sous une lumière continue de 60 µmol(photon).m^{-2}.s^{-2} à 23°C, les boîtes ont été finalement emballées dans du papier aluminium pour incubation pendant environ 15 jours en chambre de culture à 23°C.

2) Extraction des tétrades

Les boîtes de Pétri contenant les tétrades ainsi que les cellules végétatives ont été brièvement raclées à l'aide d'un scalpel. Les tétrades se différencient des cellules végétatives par leur taille plus grosse ainsi que par leur contour plus sombre.

Les tétrades ont été isolées à l'aide d'un microscope et ont été excisées le plus finement possible à l'aide d'un scalpel. Les morceaux de gel contenant les tétrades ont été inoculés dans un Eppendorf contenant 600 µL de TAP. De plus, les tétrades en cultures ont été laissées en chambre de culture à 23°C et sous lumière continue à 60 µmol(photon).m^{-2}.s^{-2} pendant 1 nuit (12 h).

Les tétrades ont ensuite été re-supendues par flux et reflux à l'aide d'une pipette, puis, la totalité de la culture de tétrade a été déposée sur une boîte de Pétri contenant du TAP gélosé. Après 4 jours en chambre de culture, les colonies issues des tétrades apparaissent sur la boîte de Pétri. La vérification des tétrades s'effectue, par la suite, par une approche de biologie moléculaire (PCR) en utilisant des amorces spécifiques aux gènes d'intérêt. Cette étape de validation PCR permet également de vérifier la présence de la cassette CIB1 ainsi que sa position (paragraphe V. D. 1 et 2).

III) Analyses biochimiques

A) Extraction des oligosaccharides-PP-Dolichol (LLO)

La fraction contenant les oligosaccharides liés à des lipides (LLO) a été obtenue par la combinaison de deux approches biochimiques que sont : l'isolement des fractions microsomales et l'extraction bi-phasique.

1) Extraction microsomale

a) C. reinhardtii

L'extraction de la fraction microsomale a été effectuée selon la méthode décrite par Pabst et collaborateurs (Pabst et al., 2012). En résumé, 1 L de culture de 4 jours de *C. reinhardtii* a été centrifugé (RC-5C PLUS, Sorvall) à 4 500 g pendant 10 min à température ambiante. Les culots cellulaires ont été lavés 3 fois dans du tampon phosphate 20 mM à pH 7,4 puis centrifugés à 2 500 g pendant 5 min à température ambiante (23°C). Le culot a ensuite été suspendu dans du tampon phosphate 20 mM à pH 7,4 contenant 0,5 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF), 1 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et 0,5 mM de dithiothréitol (DTT) dans des tubes à billes de 2 mL (Lising Matrix D, MP Biomedicals). Les cellules ont été broyées en utilisant le broyeur à billes (FastPrep-24™ 5G, MP Biomedicals) par 5 cycles de 30 sec avec une vitesse de 6.5 m.s^{-1}. Les tubes ont été laissés au repos 2 min dans de la glace entre chaque cycle de broyage. Le culot a été, par la suite, ultracentrifugé

deux fois à 20 000 g (Optima XPN-80 Ultracentrifuge, Beckman Coulter) pendant 30 min à 4°C pour culoter les résidus de paroi, puis, le surnageant a été ultracentrifugé à 100 000 g pendant 1 h 30 à 4°C permettant de récupérer un culot correspondant à la fraction microsomale.

b) *P. tricornutum*

L'extraction de la fraction microsomale de *P. tricornutum* a été effectué sur 1 L de culture *P t* .1.8.6 mis en culture 10 jours puis centrifugée (RC-5C PLUS, Sorvall) à 4 500 g pendant 10 min à 20°C. Chaque culot cellulaire a ensuite été lavés 3 fois. Tous les culots rassemblés ont été suspendu dans du tampon phosphate 20 mM à pH 7,4 contenant 0,5 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF), 1 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et 0,5 mM de dithiothréitol (DTT) dans des tubes à billes de 2 mL (Lising Matrix E, MP Biomedicals). Les cellules ont été broyées en utilisant le broyeur à billes (FastPrep-24™ 5G, MP Biomedicals) par 6 cycles de 30 sec avec une vitesse de 6.5 $m.s^{-1}$. Les tubes ont été laissés au repos 2 min dans de la glace entre chaque cycle de broyage. Le culot a été par la suite ultracentrifugé de la même manière que *C. reinhardtii* afin de récupérer un culot correspondant à la fraction microsomale.

2) Extraction bi-phasique des LLO

L'extraction par partition bi-phasique des LLO a été effectuée selon le protocole de (Garénaux et al., 2008). En résumé, les culots de microsomes de *C. reinhardtii* et *P. tricornutum* ont été repris dans un mélange contenant 400 µL d'eau déionisée, 800 µL de méthanol (LC-MS grade, Fisher Chemical) et 1,2 mL de chloroforme (LC-MS grade, Fisher Chemical) puis, ont été homogénéisés au Vortex et centrifugés à 4 000 g pendant 2 min. Après centrifugation, plusieurs phases sont distinguées, une phase supérieure (SUP) et phase inférieure (LOW) séparées par une interphase (INTER). La phase LOW, contenant les pigments a été retirée dans un tube en verre **(*Figure 22*)**.

L'échantillon restant a été à nouveau traité de manière à extraire les phases inférieures avec l'ajout de 3 mL du mélange **A** contenant du chloroforme/méthanol/$MgCl_2$ 4 mM dans de l'eau déionisée (86/14/1) (v/v/v). Ces étapes ont été répétées trois fois. Les phases inférieures récupérées après centrifugation (2 min à 4 000 g) ont été ajoutées aux tubes LOW. Le culot et la phase restante ont alors été lavés quatre fois par 3 mL de mélange **B** contenant du méthanol/$MgCl_2$ 100 mM dans de l'eau/chloroforme (16/15/1) (v/v/v). Lors de ces lavages,

après 2 min de centrifugation à 4 000 g, la phase supérieure a été retirée. Après 5 minutes de séchage à température ambiante des culots, les LLO ont été extraits trois fois par ajout de 3 mL du mélange **C** contenant du méthanol/chloroforme/eau déionisée (10/10/3 (v/v/v)). Les surnageants, contenant les LLO, ainsi obtenus après une étape de centrifugation de 2 min à 4 000 g ont été récupérés dans des tubes en verre **(*Figure 22*)**.

3) Hydrolyse acide

Afin de libérer la partie oligosaccharidique du LLO, une hydrolyse acide a été réalisée. Les échantillons contenant les LLO ont d'abord été séchés pendant environ 2 h sous un flux d'air pour éliminer tous les solvants, puis ont subi une hydrolyse acide faible par ajout de 1 mL d'acide trifluoroacétique (TFA) (LC-MS grade, Thermo Scientific) 0,1 M à 80°C pendant 1 h. Les échantillons ainsi traités contenant la partie oligosaccharidique ont été, par la suite, lyophilisés et solubilisés dans 500 µL d'eau déionisée **(*Figure 22*)**.

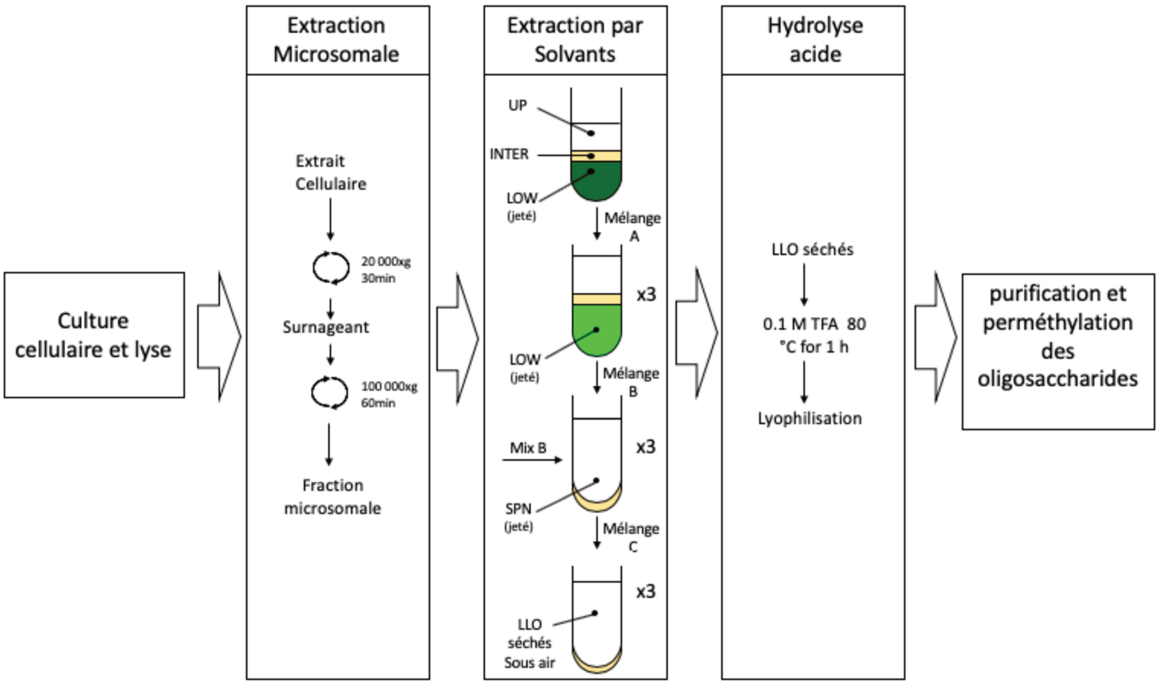


Figure 22 : Résumé des différentes étapes d'obtention des précurseurs oligosaccharidiques

LLO: Lipid-linked oligosaccharides, UP: phase supérieure, LOW: phase inférieure, INTER: phase intermediaire, SPN: surnagent. TFA: acide trifluoroacétique.

Les oligosaccharides libérés du dolichol ont été purifiés par élution sur des colonnes carbograph (Hypersep hypercarb, Thermo Fisher) de 3 mL. Avant d'introduire les échantillons, les colonnes ont préalablement été conditionnées sous une pression de 5 mm de Hg en

utilisant une enceinte manifold (Phenomenex SPE vacuum manifold). Pour cela, 3 mL d'hydroxyde de sodium 1 M (Fisher Chemical) ont d'abord été ajoutés, puis les colonnes ont été rincées avec 6 mL d'eau (LC-MS grade, Fisher Chemical). Un volume de 3 mL d'acide acétique a été, par la suite, ajouté suivi de 3 mL d'eau (LC-MS grade, Fisher Chemical) pour le rinçage des colonnes. Une fois rincées, les colonnes ont été remplies de 3 mL d'acétonitrile (LC-MS grade, Fisher Chemical) 50% puis 6 mL d'acétonitrile (LC-MS grade, Fisher Chemical) 5% suivi d'un rinçage à l'aide d'un volume de 6 mL d'eau déionisée. Les échantillons repris dans 500 µL d'eau après lyophilisation ont été, par la suite, déposés dans la colonne et rincés avec 3 mL d'eau (LC-MS grade, Fisher Chemical) en gardant une pression de 5 mm de Hg. Enfin, un volume de 3 mL d'acétonitrile (LC-MS grade, Fisher Chemical) 5% a été ajouté avant que les échantillons soient élués à pression atmosphérique avec 4 fois 0,5 mL d'une solution d'acétonitrile (LC-MS grade, Fisher Chemical) 50% contenant 0,1% TFA dans des tubes en verre. Les échantillons ont été ensuite lyophilisés avant d'être perméthylés.

4) Perméthylation

Pour plus de sensibilité lors des analyses de spectrométrie de masse, les échantillons ont été perméthylés selon la méthode décrite dans (Ciucanu and Kerek, 1984). Brièvement, un volume de 0,6 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH Pellets, Fisher Chemical) dissous dans du DMSO anhydre (Sigma-Aldrich) (4 pastilles pour 3 mL) a été introduit dans les échantillons, suivis de 0,6 mL de iodométhane (Sigma-Aldrich). Les tubes ont alors été agités pendant 1 h, puis, 1 mL d'eau a été ajouté précautionneusement afin de stopper la réaction. Un volume de 1 mL de chloroforme suivi de 5 mL d'eau déionisée ont été alors ajoutés pour créer un mélange biphasique avec les échantillons perméthylés dans le chloroforme. Une fois les deux phases bien formées, la phase aqueuse supérieure a été retirée par pipetage et les tubes ont été lavés de l'excès de soude par ajout de 3 mL d'eau. Après homogénéisation au vortex la phase aqueuse supérieure est aussi retirée par pipetage. Cette étape de neutralisation du pH a été effectuée jusqu'à ce que le pH soit autour de 7. Enfin, la phase contenant les échantillons perméthylés a été par la suite séchée et reprise dans 200 µL de méthanol (LC-MS grade, Fisher Chemical) 80% avant d'être filtrée sur une colonne C18.

5) Purification sur colonne C18

Une fois perméthylés, les échantillons ont été purifiés sur une colonne C18 (Hypersep C18, Thermo Fisher) de 3 mL selon la procédure décrite dans (North et al., 2010). Les colonnes

ont d'abord été conditionnées par 5 mL de méthanol (LC-MS grade, Fisher Chemical) puis rincées 3 fois avec 5 mL d'eau (LC-MS grade, Fisher Chemical), puis 5 mL d'acétonitrile (LC-MS grade, Fisher Chemical) et enfin à nouveau 5 mL d'eau (LC-MS grade, Fisher Chemical). Les échantillons perméthylés, repris dans 200 µL de méthanol, ont été passés sur la colonne, puis rincés avec 5 mL d'eau (LC-MS grade, Fisher Chemical) avant d'être élués successivement avec 2 mL d'acétonitrile (LC-MS grade, Fisher Chemical) 15%, 35%, 50% et 75%. Les échantillons perméthylés étant attendus dans la fraction à 50 et 75% d'acétonitrile, ces dernières ont été séchées puis lyophilisées. Le culot contenant les échantillons perméthylés a ensuite été repris dans 10 µL d'un mélange méthanol 80%/ eau 20% afin de solubiliser les glycannes perméthylés pour leur passage en spectrométrie de masse. Un volume de 8 µL a été dédié à l'analyse des glycannes par MALDI-TOF, et un volume de 2 µL a été conservé pour une analyse en LC-MS-MS.

B) Western Blot

1) Extraction des protéines totales

Les culots cellulaires centrifugés à 4 500 g (RC-5C PLUS, Sorvall) pendant 15 min ont été repris dans 1 mL de tampon d'extraction protéique 1X Agrisera (Tris Base 35 mM, Tris-HCl 26,25 mM, EDTA 125 mM, Lithium dodécyl sulfate 0,5%, glycérol 2,5%). Les cellules ont été lysées dans un broyeur à bille (FastPrep-24™ 5G) dans des tubes de 2 mL (Lysing Matrix D, MP Biomedicals) sur 5 cycles de broyage de 6,5 $m.s^{-1}$ pendant 30 s avec une pause de 2 min dans la glace entre chaque cycle. Les tubes ont ensuite été centrifugés 10 min à 10 000 g afin de récupérer le surnageant contenant les protéines. L'opération de broyage au Fastprep a été répétée dans les mêmes conditions par ajout de 1 mL de tampon Agrisera 1X sur les culots cellulaires restants. Les surnageants obtenus après 10 000 g 10 min suite au 2ème broyage ont été ajoutés au précèdent surnageant puis ont été dialysés contre de l'eau milliRo pendant 48 h à 4°C (Dialysis Tubing 3,5 KDa, Fisherbrand). Les protéines ont, alors, été quantifiées par un dosage de Bradford avec une gamme BSA allant de 5 $µg.µL^{-1}$ à 20 $µg.µL^{-1}$ (Bradford, 1976).

2) Extraction des fractions enrichies en microsomes

Un volume de 5 ml de culture cellulaire a été culoté 15 min à 4 500 g, puis la totalité du surnagent a été retiré de manière à avoir un culot bien sec. Les cellules ont été reprises dans 150 µL de tampon EB (Tris 100mM pH 7,5 ; glycérol 5% (v/v) ; sucrose 25% (m/v) ; 10 mM EDTA pH8; 5 mM KCl+ une pastille d'antiprotéases (SIGMA*FAST*™ Protease Inhibitor Cocktail

Tablets, EDTA-Free) pour 100mL) et ont été transférés dans des tubes à billes de 2 mL (Lysing Matrix D, MP Biomedicals) avant d'être broyées au Fastprep sur 3 cycles de 30 s à 6,5 $m.s^{-1}$ en respectant une étape de repos de 2 min dans la glace entre chaque cycle. Les tubes ont été ensuite introduits pendant 5 min dans un bain à ultrason (Elma D-78224, Elma Schmidbauer GmbH) puis vortéxés et introduit dans la glace. Le contenu des tubes à billes a été transféré dans des tubes Eppendorf 1,5 mL avec 1 mL de Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP, Sigma Aldrich) dans la glace pendant 5min, puis centrifugé 3min à 600 g afin de culoter le PVPP. Un volume de 100 µL de surnagent a été transféré dans un nouveau tube contenant 100 µL d'eau désionisée. Les tubes ont été centrifugés 1 h 30 à 21 000 g à 4°C afin de récupérer le culot contenant la fraction enrichie en microsomes.

3) Migration sur gel d'électrophorèse

Une quantité de 20 µg d'extraits de protéines totales ou enrichies en microsomes a été reprise dans 20 µL d'eau MilliQ et 5 µL de Loading sample buffer 5X (LSB 5X) (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), glycérol 10% (v/v), β-mercaptoéthanol 2,5% (v/v), bleu de bromophénol 0,005% (p/v)). Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 10 min afin de dénaturer les protéines. Après une courte étape de refroidissement de 5 min à température ambiante, ils ont été déposés sur un gel d'électrophorèse bis-Tris (4-12%), avec un gel de concentration à 4% d'acrylamide et un gel de migration à 12% **(*Tableau 9*)**, avec un marqueur de poids moléculaire (Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained *Rec* Protein Ladder) **(*Figure 23*)**. Les protéines ont par la suite migré dans le gel à l'aide d'une cuve électrophorèse dans du tampon de migration MOPS 1X (Invitrogen NP0001-02). La migration a été effectuée à 180 V. Le gel a par la suite été sorti de son support plastique et rincé brièvement à l'eau MilliRo avant le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.

Tableau 9 : Préparation de gel d'acrylamide bis-tris (4-12%)

Préparation gel acrylamide bis-tris 4-12%			
Gel de concentration (4%)		Gel de migration (12%)	
Acrylamide	1,7 mL	Acrylamide	7,5 mL
Tris pH6,8	0,8 mL	Tris pH8,8	6,25 mL
10%SDS	0,1 mL	10%SDS	0,25 mL
10%APS (persulfate d'ammonium)	0,1 mL	10%APS	0,25 mL
TEMED (Tétraméthyléthylènediamine)	0,01 mL	TEMED	0,01 mL
Eau	7,3 mL	Eau	10,75 mL

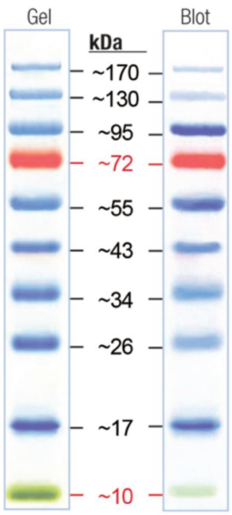


Figure 23 : Taille en kilodalton (kDa) des bandes du marqueur de taille protéique Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder

4) Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées sur le gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (88018, Thermo Scientific). Le transfert a été effectué à l'aide de l'appareil de transfert Pierce Power station. Deux papiers Whatman (Invitrogen) imbibés de tampon de transfert (1-step Transfer buffer 1X, Pierce) ont été placés l'un sur l'autre sur la borne négative de la cassette Pierce Power blot cassette, suivi de la membrane de nitrocellulose, le gel suivi de deux nouveaux papier Wathman imbibés de tampon **(*Figure 24*)**. Le transfert a, ensuite, été effectué en insérant la cassette dans l'appareil de transfert et en sélectionnant les conditions adaptées en fonction de la taille et du nombre de gels utilisés. Deux tailles de gel ont été coulés, Midi (8,7 x13,3 cm) et Mini (8 x 8 cm) **(*Tableau 10*)**.

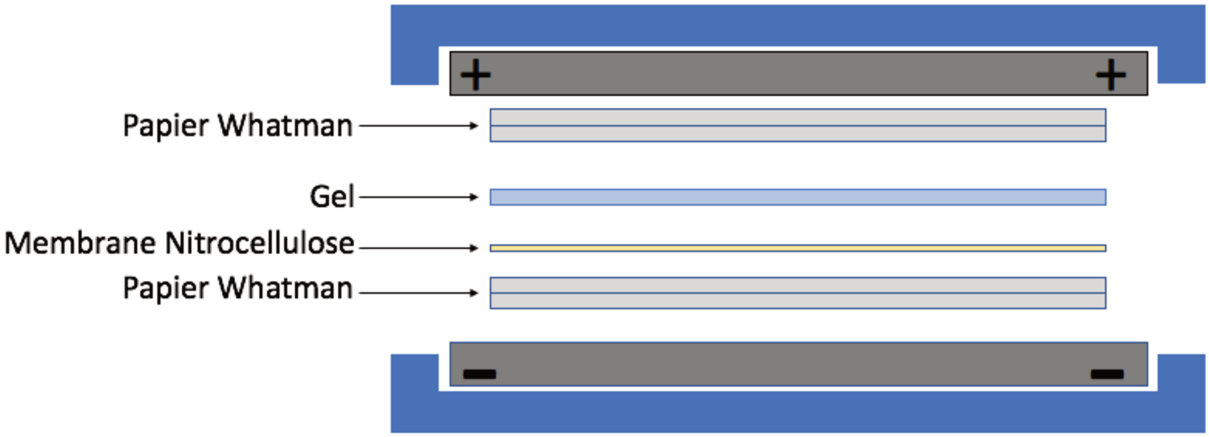


Figure 24 : Schématisation de l'empilement effectué dans la cassette Pierce Power blot lors du transfert.

Tableau 10 : Récapitulatif des conditions de transfert par type et nombre de gel utilisé

Gel	Ampérage	Temps
Mini (8 cm x 8 cm) x1	1,3 A	15 min
Mini (8 cm x 8 cm) x2	2,5 A	15 min
Midi (8,7 cm x 13,3 cm) x1	2,5 A	15 min
Midi (8,7 cm x 13,3 cm) x2	5 A	15 min

5) Vérification de la qualité de transfert des protéines au rouge Ponceau

La membrane de nitrocellulose a ensuite été trempée 5 min dans du rouge ponceau (Rouge Ponceau (Serra, C.I.27195) 1% (p/v) dans de l'acide trichloroacétique 3%), puis, rincée à l'eau afin de voir si le transfert des protéines a été correctement effectué.

6) Saturation de la membrane de nitrocellulose

La nitrocellulose a été rincée avec du tampon Tris Buffered Saline (TBS) (Tris HCl 10 mM, NaCl 500 mM pH7,5) contenant 0,1% du Tween (TWEEN® 20, Sigma Aldrich) (TBST) afin de retirer tout le rouge Ponceau, puis, la membrane a été laissée avec du TBST lait 5% toute une nuit afin de saturer la membrane de nitrocellulose pour éviter toute réaction aspécifique.

7) Marquage à l'anticorps primaire

La membrane a été rincée une fois pendant 10 min avec du TBST, puis, incubée dans des poches plastique scellées avec l'anticorps primaire dilué dans du TBST selon le ratio décrit dans le **Tableau 11**. La poche plastique contenant la membrane a été, par la suite, scellée et laissée sous agitation sur un carrousel durant 3 h afin de permettre la liaison entre l'anticorps aux protéines. Finalement, afin de retirer tous les anticorps primaires non liés aux protéines ciblées, les membranes ont été rincées 4 fois avec du TBST pendant 10 min sous agitation.

Tableau 11 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés et leurs dilutions

Dilution des anticorps primaires			
Anticorps primaire	Hôte	Dilution	Anticorps secondaire associé
Anti V5 (PA1-993, Invitrogen)	Lapin	1/5 000	Mouton anti-lapin HRP (A0543, Sigma Aldrich)
Anti HA (H3663, Sigma Aldrich)	Lapin	1/5 000	Mouton anti-lapin HRP (A0543, Sigma Aldrich)
Anti c-myc (M4439, Sigma Aldrich)	Souris	1/3 000	Mouton anti-souris HRP (AP308P, Sigma Aldrich)
Anti β(1,2)-xylose	Lapin	1/1 000	Mouton anti-lapin HRP (A0543, Sigma Aldrich)

8) Marquage à l'anticorps secondaire

La membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) dans du TBST avec une dilution au 1/50 000ème sous agitation pendant 1 h.

Dans le but de retirer les anticorps secondaires non liés aux anticorps primaires, la membrane a été rincée 4 fois pendant 10 min avec du TBST, puis, a été rincée 3 fois avec du TBS pendant 10 min afin de retirer l'excès de Tween pouvant perturber la réaction de chimioluminescence.

9) Réactif de chimioluminescence PICO-plus

La révélation des protéines liées aux anticorps s'est faite à l'aide du kit PICO-plus (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, ThermoFisher Scientific). Brièvement, 2 mL de chacun des deux réactifs (solution Peroxyde) et (solution luminol) du kit PICO-plus ont été mélangés puis versés sur la membrane de nitrocellulose pendant 5 min. Le réactif a, ensuite, été retiré de la membrane de nitrocellulose.

10) Révélation en chambre noire

Les membranes de nitrocellulose enveloppées dans du papier Saran ont été emmenées dans une chambre noire afin de révéler les protéines ayant eu une liaison avec l'anticorps primaire puis secondaire par chimioluminescence. La nitrocellulose a été mise en contact avec un film photographie (Amersham Hyperfilm™ ECL, Dutscher) pendant environ 1 à 2 min, puis, le film photographie a été introduit dans une solution de révélation (Carestream® autoradiography GBX developer/replenisher, Sigma Aldrich) dilué au 1/4ème dans de l'eau, jusqu'à apparition des bandes immunoréactives. Le film photo a, ensuite, été rincé dans de l'eau, puis, a été passé dans une solution de fixation (Kodak max-fix) diluée au 1/5ème dans de l'eau. Le film a, finalement, été rincé abondamment à l'eau puis séché.

C) Extraction des *N*-glycannes à la PNGase F

1) Extraction des protéines totales

Les protéines totales ont été extraites de la même manière que décrit dans la section (III. B. 1).

2) Clivage des *N*-glycannes à la PNGase F

Une quantité d'environ 1 à 2 mg de protéines totales extraites a été reprise dans 500 µL de tampon Tris-HCl 100 mM pH8 avec 0,1% de SDS (m/v), puis, a été introduite dans un bain-marie à 100°C pendant 10 min afin de dénaturer les protéines. Les échantillons ont, par

la suite, été refroidis à température ambiante. Un volume de 500 µL de tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8 contenant 0,5% Nonidep (IGEPAL) (v/v) a été ajouté afin de neutraliser l'excès de SDS. Ensuite, 10 U de peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) (100 units dans 0,1 mL, Roche) ont été ajoutés par tubes, et les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 24 h sous agitation continue à 150 rpm. La PNGase F est une enzyme clivant tous types de *N*-glycannes liés aux protéines à l'exception des *N*-glycannes possédant un résidu α(1,3)-fucose lié à la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) proximale **(*Figure 25*)**.

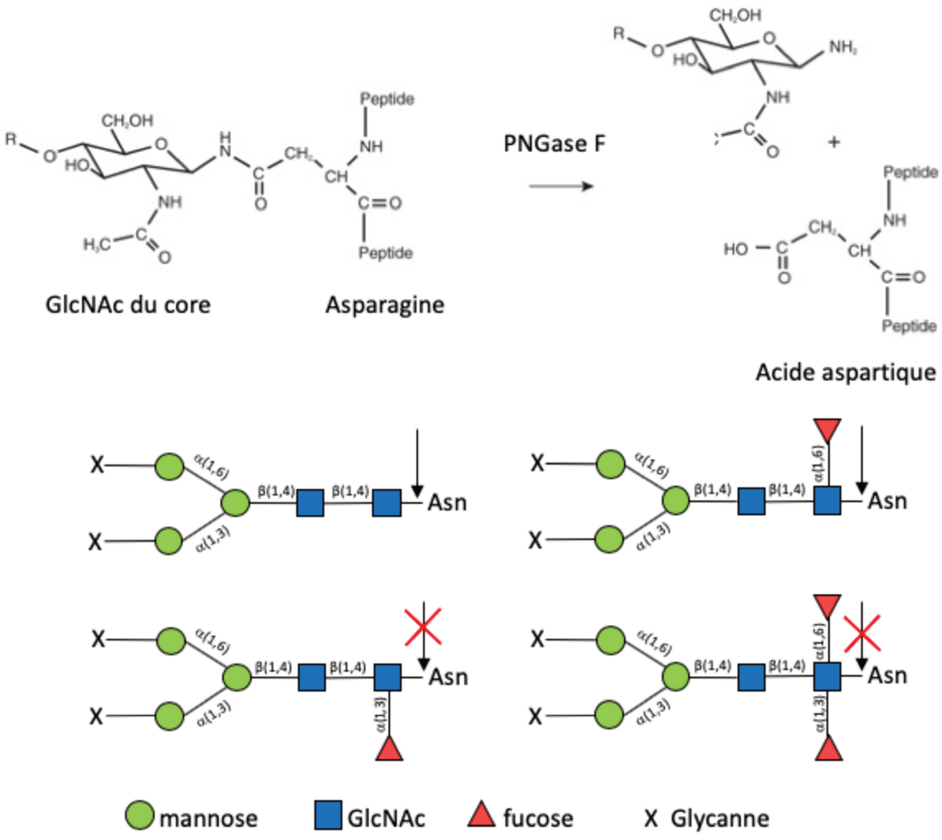


Figure 25 : Mode d'action de la PNGase F sur les N-glycannes. (Maley et al., 1989).

Asn : Asparagine.

3) Précipitation éthanolique des protéines

Après 24 h d'incubation, les échantillons ont été repris dans 4 fois leur volume avec de l'éthanol 100% HPLC grade et ont été laissés à -20°C pendant 72 h afin de précipiter les protéines. Après centrifugation 15 min à 10 000 g (Allegra X-30R centrifuge, Beckman Coulter), le surnageant éthanolique contenant les *N*-glycannes libres a été récupéré, puis séché pendant 3 h sous une rampe à air avant l'étape de purification des *N*-glycannes sur colonnes carbograph (Hypersep hypercarb).

4) Purification des *N*-glycannes sur colonne carbograph

La purification des *N*-glycannes sur colonne carbograph s'est déroulée de la même manière que décrit dans la section (III. A. 4). Les *N*-glycannes résultant de cette purification ont été séchés au Speedvac et stockés à -20°C avant d'être liés à un fluorophore.

D) Extraction des *N*-glycannes à la PNGase A

1) Extraction des protéines totales

Les protéines totales ont été extraites suivant le protocole décrit au niveau de la section (III. B. 1). Suite à un dosage de protéines au Bradford, une quantité de 5 mg de protéines ont été repris dans 500 µL de LDS 1X pour une dénaturation à 100°C pendant 10 min.

2) Séparation des protéines totales sur gel d'électrophorèse

Un volume de 250 µL (2,5 mg de protéine) de chaque échantillon a été déposé sur des gels d'acrylamide bis-tris (4-12%), coulés comme décrit dans la section (III. B. 3). Les gels ont été migrés dans des cuves d'électrophorèse avec du tampon de migration 1X et un voltage de 180 V pendant 1 h.

3) Coloration R250, décoloration

Après migration, les gels ont, brièvement, été colorés avec du R250 (30 mg bleu de coomassie (20278, Thermo), 450 mL éthanol, 450 mL eau milliRo, 100 mL acide acétique) afin de visualiser les protéines. Le gel a, ensuite, été décoloré avec une solution de décoloration (10% éthanol/20% acide acétique/70% eau) sur la nuit.

4) Excision des protéines

Une fois les contours et fond du gel bien décolorés, les gels ont été disposés sur une plaque lumineuse préalablement nettoyé à l'éthanol pour éviter toutes contamination. L'excision des protéines a été faite à l'aide d'une lame de scalpel nettoyé à l'éthanol, les bandes de gel contenant les protéines ont été découpées en petit morceau d'environ 3x3 mm^2. Les morceaux de gels ont été réunis dans un Falcon de 50 mL est la plaque a été nettoyée à l'éthanol pour exciser un autre échantillon. Les morceaux de gel ont finalement été lavés avec 20 mL de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) (Fisher Chemical) 0,1 M pH8/acétonitrile (v/v) pendant 15 min, 3 fois, afin de retirer les colorant et SDS résiduels.

5) Réduction des ponts di-sulfures

Un volume de 20 mL de NH_4HCO_3 (Fisher Chemical) 0,1 M pH8 contenant 0,1 M de dithiothréitol (DTT) a été ajouté aux échantillons. Ces derniers ont été incubés à 56°C pendant 15 min, puis, les morceaux de gel, après retrait des surnageants, ont été séchés brièvement au Speedvac pendant 5 min.

6) Alkylation des cystéines à l'iodoacétamide (IAA)

Un volume de 20 mL de NH_4HCO_3 (Fisher Chemical) 0,1 M pH8 (IAA)(Sigma Aldrich) 55 mM a été versé, puis les bandes de gels ont été laissées pendant 30 min à l'obscurité à température ambiante. Les morceaux de gels ont été lavés avec 10 mL de NH_4HCO_3 (Fisher Chemical) 0,1 M pH8/ acétonitrile (1/1) (v/v) pendant 15 min, 3 fois, afin de retirer le DTT et l'IAA. Enfin, un dernier lavage de 15 min avec 10 mL d'acétonitrile 100% permettant de déshydrater les morceaux de gels a été effectué.

7) Digestion à la trypsine

La trypsine (Trypsin TPCK Treated from bovine pancreas, Sigma Aldrich T1426-1G) a été incubée en respectant un ratio enzyme/protéine de 1/20ème dans un volume de 4 mL pour chaque échantillon pendant 45 min à 4°C afin que la trypsine pénètre le gel. Suite à ce traitement, un volume de 2 mL de tampon NH_4HCO_3 (Fisher Chemical) à 0,1 M (pH8) a été ajouté à chaque échantillon. La digestion a, par la suite, été effectuée en laissant les échantillons 12 h (une nuit) à 37°C sous agitation 130 rpm. Suite à cela, la trypsine a été inactivée par chauffage à 100°C pendant 5 min, puis, le surnagent a été récupéré dans des tubes Falcon et les gels ont été déshydratés au Speedvac pendant 10 min.

8) Digestion à la chymotrypsine

La chymotrypsine (α-Chymotrypsin from bovine pancreas, Sigma Aldrich C3142-25MG) a été administrée en respectant un ratio enzyme/protéine 1/20ème dans un volume de 4 mL pour chaque échantillon. Les échantillons ont été laissés pendant 30 min à 4°C afin que la chymotrypsine pénètre le gel. Après les 30 min, le surnagent de digestion trypsique, précédemment préservée dans un Falcon, a été ajoutée dans chaque échantillon. La digestion a par la suite été effectuée en laissant les échantillons pendant 12 h (une nuit) à 37°C sous agitation 130 rpm. Suite à cela, la chymotrypsine a été inactivée par chauffage à 100°C

pendant 5 min, puis, après refroidissement, le surnagent a été récupéré dans un tube Falcon et les glycopeptides ont été extraits du gel.

9) Extraction des glycopeptides

L'extraction des glycopeptides du gel d'électrophorèse se déroule suite à l'action de différentes solutions permettant d'extraire les peptides et les glycopeptides du gel.

Tout d'abord, 5 mL de NH_4CO_3 0,1 M pH8/ acétonitrile (v/v) ont été introduits sur les morceaux de gel, puis ont été mis sous agitation pendant 15 min. Cette solution a ensuite été retirée avec une pipette, et ajoutée dans les tubes Falcon contenant le surnagent des digestions trypsine-chimotrypsine.

Dans un second temps, 5 mL d'acide formique 5% ont alors été introduits sur les morceaux de gel, après 15 min d'agitation le surnagent a été retiré et ajouté aux précédents dans les tubes Falcon.

Dans un troisième temps, un volume de 5 mL de NH_4CO_3 0,1 M pH8 a été introduit sur les morceaux de gel. Après agitation 15 min à 150 rpm, cette solution a ensuite été retirée et a été ajoutée aux tubes Falcon contenant les précédentes extractions.

Dans un quatrième temps, un volume de 5 mL d'acétonitrile 100% a été introduit sur les morceaux de gel et agité pendant 15 min à 150 rpm. Cette solution a ensuite été retirée et ajoutée aux tubes Falcon contenant les précédentes extractions.

Finalement, 5 mL d'acide formique 5% ont été introduits sur les morceaux de gel et agitée pendant 15 min. Cette solution a ensuite été retirée et a été ajoutée aux tubes Falcon contenant les précédentes extractions.

Les surnageants d'extractions récoltés dans les tubes Falcon contenant les peptides et glycopeptides extrait des morceaux de gel ont alors été lyophilisés avant d'être repris dans 500 µL d'eau milliQ.

10) Clivage des *N*-glycannes à la PNGase A

Le lyophilisat, contenant peptides et glycopeptides, a été repris dans un tampon d'acétate de sodium à 100 mM, pH 5,5, pour effectuer une déglycosylation des glycopeptides à la PNGase A (Roche). La PNGase A isolée à partir d'amande, clive tous les types de *N*-

glycannes, y compris les *N*-glycannes végétaux possédant un résidu α(1,3)-fucose lié à la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) proximale (Lerouge et al., 1998). Pour cela, l'échantillon a été traité avec 1 mU de PNGase A (1 $mU.mg^{-1}$ de protéines, Roche), puis, incubé 24 h à 37°C sous agitation. Les *N*-glycannes libérés suite à ce traitement ont été purifiés.

11) Purification des *N*-glycannes digérés avec la PNGase A

La séparation des peptides et *N*-glycannes libérés a été obtenue à l'aide de colonnes C18 (Hypersep C18, Thermo Fisher). Les colonnes ont préalablement été conditionnées avec 5 mL d'éthanol absolu suivi de 5 mL d'eau. Les échantillons ont ensuite été introduits dans cette colonne et les glycannes ont été récupérés avec 5 mL d'eau (LCMS grade, Fisher Chemical) dans un Falcon puis lyophilisés. Les *N*-glycannes sont ensuite purifiés en utilisant une colonne carbograph en suivant le protocole décrit précédemment.

E) Marquage des *N*-glycannes à un fluorophore

Les glycannes purifiés par colonnes carbograph peuvent être par la suite couplés *via* leurs extrémités réductrices à un fluorophore. Cette liaison a pour but principal d'augmenter l'apolarité des glycannes et, donc, de faciliter leur ionisation lors de l'analyse en spectrométrie de masse. Ce marquage permet également de pouvoir orienter les fragments glycanniques en fonction de la présence ou de l'absence de ce fluorophore.

1) Marquage au 2-Aminobenzamide (2-AB)

Une quantité de 5 mg de 2-Aminobenzamide (2-AB) a été pesée et solubilisée dans un tube Eppendorf avec 100 µL d'un mélange de DMSO/acide acétique glacial (70/30, (v/v)). Ce mélange a ensuite été transféré dans un autre tube contenant 6 mg de cyanoborohydrure de sodium ($NaBH_3CN$). Le tout a été homogénéisé par flux et reflux à l'aide d'une pipette et a constitué le mix 2-AB. Un volume de 10 µL de mix 2-AB a été ajouté aux glycannes lyophilisées, puis, ces tubes ont été vortéxés et centrifugés avant d'être incubés dans un bain-marie à 60°C pendant 2 h. Suite à cette étape d'incubation, les échantillons ont été refroidis à température ambiante, puis, centrifugés à 10 000 g pendant 10 sec afin de s'assurer que les glycannes soient au fond du tube. Les *N*-glycannes marqués au 2-AB ont finalement été purifiés à l'aide de colonnes D1 Ludger.

2) Marquage à la procaïnamide (PROC)

Le kit LudgerTag Procainamide Glycan Labeling a été utilisé selon les recommandations de Ludger pour marquer les *N*-glycannes à la procaïnamide. En résumé, 150 µL de solution acide acétique 30% dans du DMSO a été introduit dans une ampoule contenant 16,2 mg de procaïnamide (PROC). Après homogénéisation par flux et reflux à la pipette, le mélange a été transféré dans une ampoule contenant 16,5 mg de réducteur 2-picoline borane. Le tout a été homogénéisé et constitue le mix PROC à ajouter à chaque échantillon de glycanne. Un volume de 10 µL de mix PROC a été ajouté aux échantillons de glycannes lyophilisées préalablement repris dans 10 µL d'eau HPLC grade, puis, les tubes ont ensuite été vortéxés et centrifugés avant d'être incubés dans un bain-marie à 65°C pendant 2 h. Après la période d'incubation, les échantillons ont été refroidis à température ambiante et brièvement centrifugés 10 sec à 10 000 g afin de s'assurer que les glycannes soient au fond du tube. Les *N*-glycannes marqués à la procaïnamide ont ensuite été purifiés à l'aide de colonnes D1 Ludger ou Ludgerclean S.

3) Purification des glycannes marqués à un fluorophore sur colonne D1 Ludger

Les *N*-glycannes marqués à un fluorophore (2AB, PROC) ont été par la suite purifiés sur des colonnes D1 Ludger. Ces colonnes ont d'abord été préparées par ajout de 2 mL acétonitrile 96% puis de 1 mL d'acétonitrile 100%. Les échantillons repris dans 0,5mL d'acétonitrile 96% ont ensuite été déposés sur les colonnes et laissés incubés pendant 15 min. Les *N*-glycannes ont été lavés avec l'ajout de 1 mL d'acétonitrile à 100%, suivi de 5mL d'acétonitrile à 96%. Les *N*-glycannes ont finalement été élués à pression atmosphérique dans des tubes Eppendorf de 2 mL avec 2 x 0,5 mL d'acétonitrile à 20% et ont été séchés au Speedvac puis stockés à -20°C.

4) Purification des glycannes marqués à un fluorophore sur colonne S Ludger

Les *N*-glycannes marqués à la procaïnamide ont été purifiés sur des colonnes Ludgerclean S. Ces colonnes sont préalablement conditionnées par ajout de 1 mL d'eau suivi de 5 mL d'acide acétique à 30% puis 1 mL d'acétonitrile à 100%. Les échantillons dans 20 µL ont été déposés sur les colonnes et laissés incubés durant 15 min. Les *N*-glycannes ont été par la suite lavés par cinq ajouts successifs d'1 mL d'acétonitrile 100% (5x 1mL).

Les *N*-glycannes marqués à la procaïnamide ont été, finalement, élués à pression atmosphérique dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL par ajout successif de 2x 0,5 mL d'eau (LCMS grade, Fisher Chemical) et ont été séchés au Speedvac, puis, stockés à -20°C.

F) Traitement enzymatique des *N*-glycannes

1) Traitement à l'α(1,2)-mannosidase

Les *N*-glycannes marqués à la procaïnamide ont, quant à eux, été digérés avec 8 mU/mL d'α(1,2)-mannosidase (Glyko®α(1-2)-Mannosidase [GKX-5009], Prozyme) dans 30 µL d'eau (LC-MS grade, Fisher Chemical). La digestion a été effectuée pendant 24 h dans une étuve à 37°C sous agitation (150 rpm). Les *N*-glycannes digérés obtenus ont été séchés au Speedvac et analysés par nanoLC-ESI-MS **(*Figure 26*)**.

2) Digestion à l'α-mannosidase (Jack bean)

Les *N*-glycannes marqués à la procaïnamide ont été digérés avec 50 U/mL d'α-mannosidase (α-Mannosidase from *Canavalia ensiformis* (Jack bean), Proteomics Grade, M5573, Sigma Aldrich) dans 20 µL d'eau (LC-MS grade, Fisher Chemical). La digestion a été effectuée pendant 24 h dans une étuve à 37°C sous agitation (150 rpm). Les *N*-glycannes digérés ainsi obtenus ont été, par la suite, séchés au Speedvac et analysés par nanoLC-ESI-MS **(*Figure 26*)**.

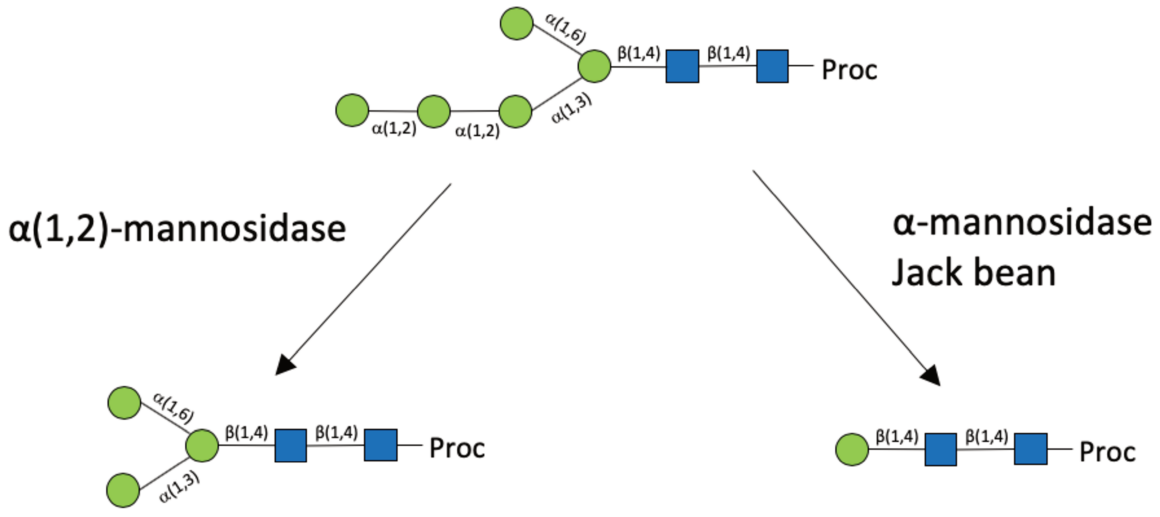


Figure 26 : Illustration des profils glycanniques suite aux digestions enzymatiques α(1,2)-mannosidase et α-mannosidase extraite du haricot (Jack bean)

Proc : procaïnamide, Carré bleu : N-acétylglucosamine, rond vert : Mannose

IV) Analyses par spectrométrie de masse

A) Analyse par MALDI-TOF-MS

1) Oligosaccharide précurseur

Les analyses de MALDI-TOF-MS ont été effectuées avec un spectromètre de masse à temps de vol Autoflex III (Bruker Daltonics (Bremen, Germany) équipé d'un laser grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (Nd : YAG laser, longueur d'onde 355-nm), avec les logiciels FlexControl 3.3 et FlexAnalysis 3.3. L'acquisition des spectres a été effectuée en mode réflectron positif la gamme de masse comprise entre m/z 500 et 4 000 avec une fréquence laser de 100 Hz, et une moyenne minimale de 3 000 spectres individuels. L'accélération de voltage de l'instrument à 19 kV. La calibration du MALDI-TOF a été effectuée en utilisant les pics monoisotopiques monochargés de l'angiotensine II (5 pmol.µL^{-1}), la substance P (5 pmol.µL^{-1}), l'ACTH 18-39 (5 pmol.µL^{-1}) et l'insuline B (10 pmol µL^{-1}). L'acide 2,5-dihydrohybenzoique (DHB) a été utilisé comme matrice. Un volume de 1 µL de chaque échantillon est mélangé dans 1 µL de matrice DHB (10 mg.mL^{-1} dans de l'ACN/eau (70/30: v/v) contenant 0,1% de TFA) puis, 0.7 µL du mélange échantillon/matrice est déposé et séché sur la plaque MALDI (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

B) Analyse par nanoLC-ESI-MS

1) Oligosaccharide précurseur

Deux µL issus des 10 µL des glycannes perméthylés (fraction 75% acétonitrile) ont été conservés, puis, séchés afin d'être analysés en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse à l'aide d'un nanoLC-chip-QTOF (Agilent Technologies) disponible sur la plateforme PISSARO de l'université de Rouen Normandie.

Les analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées sur le système nano-LC 1200 couplé à un spectromètre de masse Q-TOF 6520 équipé d'une source d'ionisation nano-électrospray et d'une interface HPLC-chip cube (Agilent Technologies). Les *N*-glycannes sont enrichis et dessalés sur une colonne 360 nL RP-C18 trap, puis, séparés sur une colonne Polaris C18 (3 µm de taille de particules, 150 mm de long x 75 µm de diamètre interne ; Agilent Technologies). Un gradient linéaire de 33 min (3%-75% acétonitrile dans 0,1% d'acide formique) à un débit de 320 nL.min^{-1} est utilisé et les glycannes séparés sont analysés par le spectromètre de masse QTOF. Au niveau des paramètres d'acquisition, tous les scans

autoMS1 sont enregistrés sur la fenêtre de masse m/z 290 à 1 700 et tous les scans autoMS2 sont enregistrés sur la fenêtre de masse m/z 59 à 1 700. A chaque cycle, un maximum de 5 précurseurs est trié en fonction de l'état de charge (les dichargés sont préférentiellement sélectionnés), ces précurseurs sont isolés et fragmentés dans la cellule de collision. L'énergie de collision est automatiquement ajustée en fonction du rapport m/z. La vitesse de balayage est fonction de l'abondance du précurseur (25 000 comptes/spectre). Une exclusion de ces précurseurs est activée après 3 spectres dans les 1,5 min et le seuil de sélection de ces précurseurs a été fixé à 1 000 comptages.

2) Glycannes marqués à un Fluorophore

Les *N*-glycannes marqués à la procaïnamide repris dans de l'acétonitrile 5% avec 0.1% d'acide formique, ont été respectivement analysés avec un système nano-LC1200 couplé à un spectromètre de masse Q-TOF 6545 XT AdvanceBio équipé d'une source nanospray est d'une interface HPLC-chip cube (Agilent Technologies). Un gradient linéaire de 26 min (3%-85% acétonitrile dans 0,1% d'acide formique) à un débit de 450 $nL.min^{-1}$ est utilisé pour séparer les glycannes sur une colonne-chip de carbone graphite (150 mm long x 75 µm diamètre interne). Tous les scans autoMS1 de m/z 290 à 3 200, et les scans autoMS2 de m/z 59 à 3 200 ont été enregistrés. A chaque cycle, un maximum de 5 précurseurs trié par l'état de charge (1+ préférés) a été isolé et fragmenté dans la cellule de collision avec une énergie de collision fixe (CE 25, 30, 35 and 45 eV). Une exclusion de ces précurseurs est activée dans les 0,2 min après un spectre, et le seuil absolu de sélection du précurseur est fixé à 1 000 comptages (seuil relatif 0.001%). La vitesse de scan varie en fonction de l'abondance du précurseur (15 000 comptages/spectre) avec une rigueur de pureté de 100% et un seuil de pureté à 30%.

C) Analyse par ESI-MS^n

Les *N*-glycannes perméthylés ont été analysés par ESI-MS^n (n = 1 à 4) avec un spectromètre de masse Bruker HCT Ultra ETD II comportant un piège à ions quadripolaire (QIT) et équipé des logiciels Esquire control 6.2 et Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Les paramètres de l'ESI sont les suivants : Voltage du capillaire et du « end plate » respectivement fixés à −3,5 kV et −3,0 kV en mode d'ionisation positive, voltage du skimmer et de la sortie du capillaire fixés à 40 V et 200 V respectivement, gaz de nébulisation (N2). Pression en Hélium dans le piège à ions à 1,2 Å ~ 10^{-5} mbar. L'acquisition des données a été effectuée sur la gamme de masse *m/z* 200 et 2 200, avec une vitesse de scan de *m/z* 8 000 par

seconde. Le nombre d'ions entrant dans le piège a été automatiquement ajusté en contrôlant le temps d'accumulation en utilisant le mode de control des charge ionique (ICC) (target 200 000) avec un temps d'accumulation maximum de 50 ms. La valeur du LMCO a été de *m/z* 140 pour le précurseur glycannique. Le nombre moyen de spectre et la moyenne mobile ont été de 6 et 2 respectivement. Les expériences d'ESI-MS^n ont été conduit par dissociation induites par des collision CID utilisant l'hélium comme gaz de collision, l'ion précurseur et les ions intermédiaires a été isolé avec une fenêtre de *m/z* 2 en utilisant une fréquence de résonnance avec une amplitude de 0,8 à 1,0 Vp–p. La solution échantillon a été introduite dans la source avec un débit de 300 $\mu L.h^{-1}$ à l'aide d'une seringue (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, USA).

D) Analyse en ESI-IMS-MS^2

Les analyses d'ESI-IMS-MS^2 ont été effectuées avec le spectromètre de masse Waters SYNAPT G2 hybrid quadrupole/HDMS équipé d'une source ESI LockSpray™, et des logiciels MassLynx 4.1 et DriftScope 2.2 (Waters, Manchester, UK). Le système SYNAPT HDMS a été calibré en utilisant des groupes d'ions générés par le formate de sodium (2 $mg.mL^{-1}$) et opéré en mode sensible (résolution 10 000 FWHM). Les paramètres ESI en mode positive sont les suivant : voltage capillaire 3,1 kV, voltage du cône 80 V, température de la source 100°C, température de désolvatation 250 °C ; débit du gaz de désolvatation (N_2) 700 $L.h^{-1}$ et débit du gaz dans le cône (N2) 30 $L.h^{-1}$. Les données ont été acquises sur une gamme de masse de m/z 50 à 2 000 sur une durée de scan de 1 s et 0,02 s d'interscan. Les solutions d'échantillons ont été infusées dans la source sous un flux de 300 $\mu L.h^{-1}$ à l'aide d'une seringue (Cole-Palmer, Vernon Hills, Illinois, USA). Les conditions IMS ont été optimisées de manière suivante : débit du gaz (N_2) 70 $mL.min^{-1}$, pression IMS 3 mbar, amplitude 40 V et vitesse de l'onde 700 $m.s^{-1}$. Les expériences d'IMS-MS^2 ont été acquises pendant approximativement 4 min, comprenant la sélection de l'ion précurseur $[M+2Na]^{2+}$ par le quadrupole sur une fenêtre de masse de m/z 1, et la fragmentation dans la cellule de collision (voltage de collision 70 V) générant les ions-produits après séparation par mobilité. Le spectre de mobilité ionique a été affiné en utilisant le logiciel Origin 9.0 (OriginLab).

V) Biologie moléculaire

A) Extraction des acides nucléiques

1) Extraction ADN de *C. reinhardtii*

L'extraction d'ADN de *C. reinhardtii* a été effectuée sur des colonies mises en culture sur milieu TAP gélose pendant 4 jours. Une petite quantité de cellules (volume équivalent à 1 µL) a été récupérée avec la pointe d'un cône Eppendorf et re-solubilisée dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL avec 50 µL d'EDTA 10 mM dans de l'eau milliQ. Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 10 min, puis, ont directement été placés dans la glace durant 2 min. Après une brève homogénéisation par vortex, les tubes ont été centrifugés 1 minute à 10 000 g, puis, le surnagent contenant l'ADN a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Cet ADN récolté a, par la suite, été utilisé lors des étapes de PCR.

2) Extraction ARN de *C. reinhardtii*

Les cellules ont été mises en culture pendant 4 jours dans 20 mL de TAP à 23°C sous une agitation de 150 rpm afin d'obtenir environ 20.10^7 cellules.mL^{-1}. Après avoir culotées les cellules 15 min à 4 500 g, ces dernières ont été reprises dans des tubes Lysing Matrix D de 2 mL (MPbiomedicals) avec 1 mL de Trizol® (TRIzol RNA isolation reagent, Thermofisher). Les cellules ont été broyées au Fastprep (Fast Prep-24 5G™ High Speed Homogenizer, MPbiomedicals) lors d'un passage de 2 cycles de 30 s à 6,5 m.s^{-1} et 2 min dans la glace entre chaque cycle. Après 5 min à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés 5 min à 14 000 g. Le surnageant a été transféré dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml où 200 µL de chloroforme ont été additionnés (LC-MS grade, Fisher Chemical). Les tubes ont été laissés 3 min à température ambiante puis ont été centrifugés15 min à 12 000 g à 4°C. La phase aqueuse supérieure a ensuite été transférée dans un nouveau tube avec le même volume d'isopropanol afin de précipiter les ARNs, puis, le mélange a été laissé 15 min à température ambiante et centrifugé à 16 500 g pendant 15 min. Le culot obtenu a été lavé avec 400 µL d'éthanol à 70%, puis, centrifugé 20 min à 17 000 g. Après cette étape de lavage, le culot a été repris dans 40 µL d'eau (Molecular biology grade, Fisher Scientific). De plus, un traitement enzymatique a été effectué en utilisant le kit « TURBO DNA-free kit » (ThermoFisher Scientific). Un volume de 20 µL d'ARNs a été mélangé à 1 µL de Turbo DNAse et 5 µL de Tampon à 10% dans un volume total de 50 µL complété avec de l'eau (Molecular biology grade, Fisher Scientific). Après 30 min à 37°C, les échantillons ont été refroidis 5 min à

température ambiante et un volume de 5 µL de « stop réaction » a été ajouté afin d'arrêter la réaction enzymatique. L'arrêt de cette réaction est abouti au bout de 5 min. Suite à cela et après une centrifugation d'une minute à 10 000 g, le surnageant contenant les ARNs a été stocké à -80°C avant son utilisation ultérieure.

3) Transcription inverse (RT)

La transcription inverse (reverse transcription) a été effectuée sur les ARNs en utilisant le kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit » (ThermoFisher Scientific). Une quantité de 2 µg d'ARNs a été repris dans 10 µL d'eau (Molecular biology grade, Fisher Scientific) avec 1 µL de « Multiscribe® Reverse Transcriptase », 2 µL de « random primers 10X », 0,8 µL de mix dNTP (100 mM) (GTP à 25 mM, ATP à 25 mM, CTP à 25 mM et TTP à 25 mM), 2 µL de tampon RT 10X, 1 µL d'inhibiteur ADNase dans un volume total de 20 µL complété avec de l'eau (Molecular biology grade, Fisher Scientific). La transcription inverse a été effectuée dans un thermocycleur (Labcycler, SensoQuest) avec une première étape à 25°C durant 10 min, suivie par 2 h à 37°C pour la transcription inverse et, enfin, une dernière étape de dénaturation à 87°C pendant 5 min. Les ADNs complémentaires obtenus ont été refroidis à température ambiante puis stockés à -20°C avant utilisation en PCR.

B) Réaction par polymérase en chaîne (PCR)

La PCR ou réaction en chaîne par polymérase est une pratique de biologie moléculaire visant à amplifier une portion d'ADN comprise entre deux segments d'ADN défini appelés amorces à l'aide d'une enzyme appelée polymérase. Dans cette thèse, différents couples d'amorces, détaillés au niveau du **Tableau 12**, ont été utilisés pour amplifier de l'ADN génomique (ADNg) et de l'ADN complémentaire (ADNc) de plusieurs souches de *Chlamydomonas reinhardtii*

Tableau 12 : Liste des amorces utilisées avec leurs séquences nucléotidiques, leurs gènes cibles, la taille attendue des fragments amplifiés et les températures d'hybridation (Tm) en PCR.

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique	Cible	Taille (pb)	Température d'hybridation Tm
CBLP For	CTTCTCGCCCATGACCAC	CBLP	254 (ADNg) 104 (ADNc)	60
CBLP Rev	CCCACCAGGTTCAG			
TbGT11 For	CCCCCAGTTCGACTACAAGT	TbGT11	582	60
TbGT11 Rev	CACTCGTTGCCGTTCAGGAT			
TbGT15 For	CATCATCTCCCTGCCGATGG	TbGT15	524	62
TbGT15 Rev	TGCAGAAGCCGTAGTTCAGG			
XTA For	GCCTCGCTACCTCAAAAGTG	Cre09.g391282 XTA	1147 (ADNg)	60
XTA Rev	GGAAGTCAGTCGAGTCCAGC			
XTB For	ACACTGCCTTGAGAGGGAGA	Cre16.g678997 XTB	1716 (ADNg)	60
XTB Rev	GCTAACTGTGCTCGTCCTCC			
PtGnTI For	CCAGTCCAAGTGGCCGGGC	PtGnTI	559	60
V5 Rev	GGAGTCCAGGCCCAGCAGG			
AtGnTI For	GCCCTAAGTGGCCAAGGC	AtGnTI	539	60
V5 Rev	GGAGTCCAGGCCCAGCAGG			
XTA For	GCCTCGCTACCTCAAAAGTG	XTA-CIB1	809 (ADNg)	58
OMJ 944	GACGTTACAGCACACCCTTG			
XTA Rev	GGAAGTCAGTCGAGTCCAGC	CIB1-XTA	622 (ADNg)	58
OMJ 913	GCACCAATCATGTCAAGCCT			
XTB For	ACACTGCCTTGAGAGGGAGA	XTB-CIB1	874 (ADNg)	58
OMJ 944	GACGTTACAGCACACCCTTG			
XTB Rev	GCTAACTGTGCTCGTCCTCC	CIB1-XTB	1113 (ADNg)	58
OMJ 913	GCACCAATCATGTCAAGCCT			
XTAEX8 For	ATGTTTTACGTCCAGTCCGC	XTA	211 (ADNc)	60
XTAEX9 Rev	CGAGGTGCTGCACAACAG			
XTBEX4 For	GGTACCGCGTGACCAGGC	XTB	274(ADNc)	60
XTBEX4 Rev	TTGACTTCTGGCTGGCTGAG			
OMJ282 For	ATGCTTCTCTGCATCCGTCT	Locus control	1315 (ADNg)	58
OMJ284 Rev	ATGTTTTACGTCCAGTCCGC			

Les réactions de PCR ont été effectuées en introduisant 1 µL d'ADNg ou ADNc dans le mélange PCR décrit dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Mélange PCR effectué par échantillon

Mélange PCR par échantillon	
Amorce Forward (10 µM)	0,4 µL
Amorce Reverse (10 µM)	0,4 µL
GoTaq (polymérase)	0,1 µL
dNTPs(100 µM)	0,1 µL
Tampon 5X	4 µL
ADNg/ADNc	1 µL ou colonie
Eau DNA free	qsp 20 µL

Les échantillons, contenant l'ADN à amplifier et le mélange décrit plus haut, ont été introduits dans un thermocycleur (Labcycler, SensoQuest). Différents cycles de température nécessaire à l'amplification du fragment d'ADN souhaité ont été testés **(*Tableau 14*)**. Il est important de noter que la température d'hybridation est une valeur dépendante des amorces et est nommée Tm **(*Tableau 12*)**. De même, le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier en se référant à la vitesse d'amplification de la polymérase de 1 000 $kb.min^{-1}$.

Tableau 14 : Résumé d'un programme de PCR dans le thermocycleur.

Étapes		Températures	Temps
Dénaturation		95°C	5 min
Cycles 35-40	Dénaturation	95°C	30 s
	Hybridation	Tm	30 s
	Élongation	72°C	Selon taille de l'amplification
Fin		72°C	10 min
		15°C	Jusqu'à migration

C) Électrophorèse des acides nucléiques

1) Électrophorèse des acides nucléiques

Après amplification, les produits PCR sont déposés puis séparés par électrophorèse sur un gel Tris Acétate EDTA (TAE) 0,5X agarose (Molecular biology grade, Fisher Scientific) (1 à 2% en fonction de la taille des fragments attendus) avec 5 µM d'intercalant ADN safeview (SafeView™ FireRed, Applied Biological Materials Inc). Les échantillons sont migrés sur des cuves d'électrophorèse (Mupid®-One, Eurogentec) dans du tampon TAE 0,5X sous 110 mV pendant 20 à 30 min en fonction de la concentration en agarose du gel. La révélation des bandes d'ADN est effectuée en introduisant le gel de migration dans l'appareil de révélation UV (Ebox, Vilber).

D) Vérification d'insertion de la cassette CIB1 des mutants

Lors de la réception de mutants issus de la Chlamylibrary, il est fortement conseillé de vérifier par une approche PCR la présence de la cassette d'insertion CIB1 sur le gène d'intérêt et sur le locus décrit par la banque de mutants. Cette étape de vérification s'effectue en deux temps : une première étape de vérification de la mutation sur le gène ciblé et une deuxième étape visant à vérifier si le site exact d'insertion de la cassette de résistance est bien celle décrite par la banque de mutants.

1) Vérification de la mutation

Après avoir extrait l'ADN des mutants et de la souche sauvage de référence, une PCR d'amplification est effectuée en prenant des amorces sens (Forward) et antisens (Reverse) encadrant le site d'insertion théorique afin d'avoir au minimum 500 pb de chaque côté de l'insertion **(*Figure 27*)**.

Dans le cas de la souche sauvage, la PCR donnera l'amplification théorique souhaitée. En revanche, dans le cas d'une souche mutante, si les amorces choisies encadrent bien le site d'insertion de la cassette de résistance, il ne devrait pas y avoir d'amplification, ou une amplification plus grande correspondant à l'amplification théorique plus la taille de la cassette.

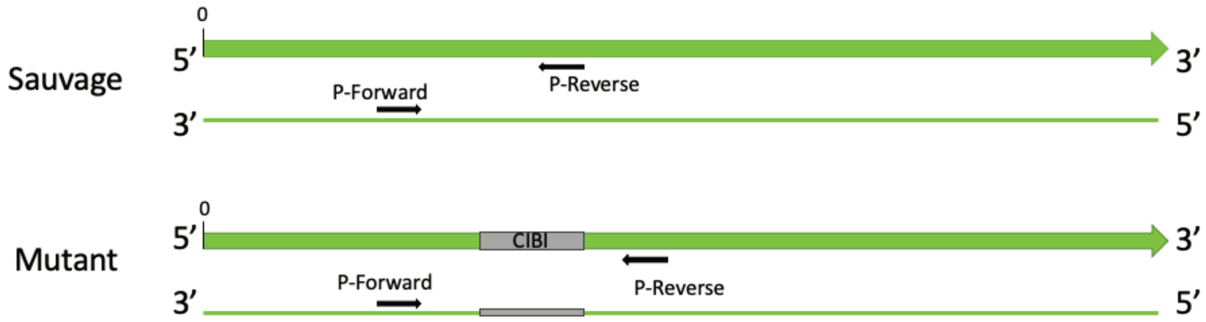


Figure 27 : Schématisation de la vérification de la mutation par PCR

CIB1 : cassette d'insertion avec résistance à l'ampicilline, flèches vertes : séquence d'ADN, flèche noire : amorce.

2) Vérification du site d'insertion

Une fois la première étape de vérification validée, il faut vérifier que l'insertion sur le génome et bien celle référencée par la banque. Pour cela, les amplifications sur les jonctions génome-cassette ont été effectuées. Ces amplifications résultent de deux PCRs entre les amorces déjà utilisées pour la vérification de la mutation et deux amorces présentes sur les extrémités de la cassette CIB1. Ainsi, les fragments obtenus entre l'amorce sens du gène (P-Forward) avec l'amorce antisens de la cassette (PC-Reverse) et l'amorce antisens du gène (P-Reverse) avec l'amorce sens de la cassette (PC-Forward) permettront de confirmer le site exact d'insertion de la cassette sur le gène **(*Figure 28*)**.

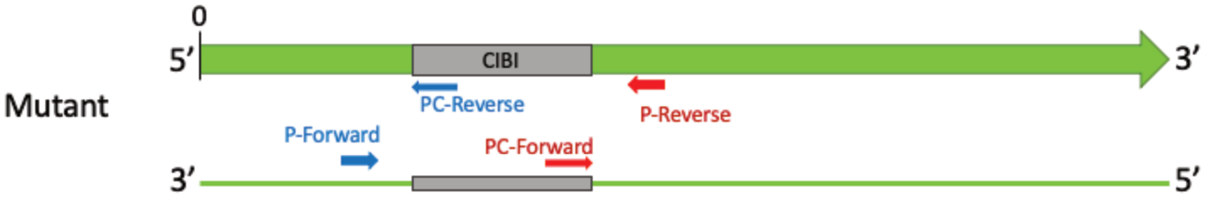


Figure 28 : Schématisation de l'amplification des jonctions génome-cassette

CIB1 : cassette d'insertion avec résistance à l'ampicilline, flèches vertes : séquence d'ADN, flèches bleues : amorces d'amplification coté 5' de CIB1, flèches rouges : amorces d'amplification coté 5' de CIB1.

E) Préparation des plasmides de transformation de la microalgue *C. reinhardtii*

Dans le but de produire des glycoprotéines dotées de *N*-glycannes « humanisés » au sein de la microalgue *C. reinhardtii, des approches d'ingénierie métaboliques ont été initiées. En effet, la microalgue* a été transformée à l'aide de différentes séquences génomiques codant pour des glycosyltransférases exogènes. Ces travaux amorcés durant cette thèse, consistent à exprimer deux « *N*-acétylglucosaminyltransférase-likes » de *Trypanosoma brucei* TbGnT I et II, ainsi que deux α(1,2)-mannosidases appartenant à *Aspergillus saitoi* et *Trychoderma reesei, respectivement,* avec un signal de rétention HDEL retenant les enzymes dans le RE. La préparation des plasmides PtGnT I et AtGnT I ayant déjà été traitée lors de la thèse de Gaétan Vanier en 2016, leurs constructions ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

1) Synthèse de séquence d'intérêts

Les séquences génétiques TbGnT II (TbGT11) et TbGnT I (TbGT15) de *T. brucei*, ainsi que les α(1,2)-mannosidase *d'A. saitoi* (AsMan) et de *T. reesei* (TrMan) ont été synthétisées en tenant compte du biais de codon propre à *C. reinhardtii*. En effet, cette microalgue ayant un génome composé à plus de 60 % de base GC, les codons des séquences ont été optimisées en utilisant les codons les plus fréquemment utilisés par *C. reinhardtii* **(*Tableau 15*)**. Ces séquences optimisées ont par la suite été complétées par l'ajout de tag (HA, V5 ou c-myc) en position *C*-terminale ainsi que du signal de rétention HDEL pour AsMan et TrMan.

Tableau 15 : Biais de codon du génome nucléaire chez C. reinhardtii

Acide Aminé	Codon	Fréquence (‰)	Acide Aminé	Codon	Fréquence (‰)
Gly(G)	GGG	9,72	Trp (W)	TGG	13,22
	GGA	4,96	Stop	TGA	0,54
	GGT	9,48		TAG	0,44
	GGC	61,99		TAA	1,05
Glu (E)	GAG	53,48	Cys (C)	TGT	1,43
	GAA	2,79		TGC	13,08
Asp (D)	GAT	6,67	Tyr (Y)	TAT	2,58
	GAC	41,67		TAC	22,78
Val (V)	GTG	46,52	Leu (L)	TTG	3,98
	GTA	2,04		TTA	0,59
	GTT	5,13	Phe (F)	TTT	5,02
	GTC	15,45		TTC	27,14
Ala (A)	GCG	44,45	Ser (S)	TCG	16,08
	GCA	10,62		TCA	3,21
	GCT	16,72		TCT	4,74
	GCC	54,61		TCC	16,13
Arg (R)	AGG	2,74	Arg (R)	CGG	11,20
	AGA	0,68		CGA	2,00
Ser (S)	AGT	2,59		CGT	4,93
	AGC	22,81		CGC	34,91
Lys (K)	AAG	43,31	Gln (Q)	CAG	36,35
	AAA	2,44		CAA	4,23
Asn (N)	AAT	2,75	His (H)	CAT	2,19
	AAC	2,49		CAC	17,25
Met (M)	ATG	25,68	Leu (L)	CTG	65,22
Ile (I)	ATA	1,05		CTA	2,58
	ATT	7,99		CTT	4,45
	ATC	26,64		CTC	13,03
Thr (T)	ACG	15,90	Pro (P)	CCG	20,65
	ACA	4,07		CCA	5,05
	ACT	5,16		CCT	8,12
	ACC	27,74		CCC	29,51

a) Séquence optimisée TbGT11 avec Tag-V5 en rouge

GCCACCATGGCGATCAAGTCCCGCGGCGTGAAGGTGGTGATCATCGTGTTCATCGCGGTGTACGTGCTGACGATCACCAA
CGTGCTGATCAGCCTGCACCGCTTCCACCAGAACAGCCAGAAGGAAGTGGTGAAGATCCAGCGGGACGAGCCCCTGCCG
GACTTCGAGTACACCGAGGACGACAAGATGGCCCTGGAGTTCGTGACGCCGCACATCATCAAGAAGTGGCGCAACCACA
ACTACCTGGTGGCCCTCGGCATCCCCTCCCCGGACAACGAGGAGCGCCGCCGCCGCCGGCAGCTGCAGCGCGACACCTGC
TGGAAGTACCCCGGCGTGGCCACCGTGGAGAACAACTTCGAGGGCGACATGCTCGTGGCCTACGTCCTGGCGCGCCACCC
CCAGTTCGACTACAAGTACAGCCCGGAGCTGAAGGACGAGGCCAACAAGTGGCGCGACGTGATCACCCTGCCCATCAAC
GAGGGCCGGGTGACCACCAAGAAGAAGCTGGGCGAGGTGGCGCACTGGGGCATCGACGCCGAGATCGGCATGTCCCGC
AAGATCTACCTGTGGTTCGAGCTGGGCGCCCGCCTGCTGCCCAAGACCTCCTACTTCAGCAAGGGCGACGACGACGCGTT
CTTCCACTCGCCGCAGTACATCATCGACCTGCGCACCCTGCCCCGCCGCGGGGTGTACTGGGCCTTCCACTGGCGCATCAA
CCCCGTGCGGCCCTTCATCTTCGGGCGCGGCCTGCTCTACACCATGTCGCGCGACGTGGTGAACAAGTTCGTGACGTACGA
GCCGGTGCGCCGGCTGGTGCACGTGCCCTTCAGCTTCGACCGCCTCCTGGAGTTCAAGCAGTCGATCATGGAGTACGAGG
ACGCCATGGTCGGCCACGCCCTGAGCTACCAGAACCCCGAGGAGCTGCTGTTCGTGAACGAGTCCTGCTGCCGCTTCATC
ATCCTGAACGGCAACGAGTGCAAGCCCCCCAAGAACAACAACTTCGTGGTGGTGCACGGCATCCAGGAAGAGGAGTACG
CCATCATGATGGAGCGCTTCAAGAACTACACCACCCCGGTGCCCGTGCAGTTCATCCCGTCGAAGTACGGCTGGATGGCG
AACTGCACCCTGCCCCCCGACCCGCAGCGGCGCCGCGACGCGGAGTGGACCGCCGGCAAGCCCATCCCCAACCCCCTGCT
GGGCCTGGACAGCACCTAA

b) Séquence optimisée TbGT15 avec Tag-HA (rouge)

GCCACCATGGTCTGGAGCGGCCACAAGTACAAGCGCCTGCTGCCCCTGTGCCTGCTGACGCTGCTGTGGTTTCTGAGCCTG
TCGCGGTTCCGGCGCGTGGAAGTGCCCAAGCAGCGCGAGAACATCCAGCACAGCTTCGAGCCCACCCTGACCACCCTGAA
CGAAGAGGACCTGCAGTCCGTGCAGTTCATCCCGCAGGCGACCGTGGACGTCCTGCGGCGCCGCGACTTCTTCGTGGCGG
TGGGCTTCCTGAGCCCCGACAACAACGAGCGCCGCCGCCGCCGCTACCTCCTGCGCCTGACCTCCTTCCAGTACCCCGGCG
TCGCCACCAAGAGCAACAACTTCAGCGGCGAGCTGATGATCGCGTTCATCCTGGCCCGCCACCCCGACCACAACTACACCT
TCAGCGCGAAGCTGAAGGAAGAGGCCTGGCACTGGAACGACATCATCTCCCTGCCGATGGACGAGGGCAAGGTGTCGAC
GAACAAGACCACCGGCGACGGCACCCACTGGGGCCCCGCCACCGAGATCGGCATGTCGCGCAAGGTGTTCCACTGGTAC
GACTTCGCGCTGCGTTTCTTCCGCAACGTGACCTACATCAGCAAGGCAGACGACGACGCCTTCCTCCACGTGCCCCAGTTC
CTGGCCGACCTGCACACCCTGCCCCGCCGCCGCGTGTACTGGGGCTACATGAAGCCCATGACCGTGAAGGACCCCTTCTAC
TTCGCCGCCGGCATCCTGTACACCCTGTCCCGGGACGTGTCCGAGGCGTTCGTGGCCTACGAGCCCCTGCGCAAGATCATC
CGCGTGCCCTACTCGAAGGAGCGCGAGATGGAGTTCAAGCCGCTCATCCTGGAGAACGAGGACATCATGGTGGCCCGCG
TGATCAGCTACCTGCGCCTGGACAACCTGCGCTACTACGTGGAGAGCTGCTGCCGCTTCAACGACCTGAACTACGGCTTCT
GCAGCGGCGTGCGCGACACCTCGGTGATCATCCACGGCGTGAAGGAAGGCCAGTACGCCGACATCGTCAACCGCCTGGG
CAAGCACCGCACGGTGGCCAACCCCTTTTACCGCGGATACCTGGGCTGGCACGCGAGCTGCACCTACCCTTACGACGTTCC
CGATTACGCCTACCCCTATGACGTGCCTGATTACGCTGACCGTTCTGGCCCTTACCCTTACGATGTGCCCGACTACGCTTAA

c) Séquence optimisée AsMan avec Tag-c-Myc (rose) et peptide signal HDEL (jaune)

ATGCACCTGCCCAGCCTGAGCCTGAGCCTGACCGCCCTGGCCATCGCCAGCCCCAGCGCCGCCTACCCCCACTTCGGCAGC
AGCCAGCCCGTGCTGCACAGCAGCAGCGACACCACCCAGAGCCGCGCCGACGCCATCAAGGCCGCCTTCAGCCACGCCTG
GGACGGCTACCTGCAGTACGCCTTCCCCCACGACGAGCTGCACCCCGTGAGCAACGGCTACGGCGACAGCCGCAACGGCT
GGGGCGCCAGCGCCGTGGACGCCCTGAGCACCGCCGTGATCATGCGCAACGCCACCATCGTGAACCAGATCCTGGACCAC
GTGGGCAAGATCGACTACTCGAAGACCAACACCACGGTGAGCCTGTTCGAGACCACCATCCGCTACCTGGGCGGCATGCT
GAGCGGCTACGACCTGCTGAAGGGCCCCGTGAGCGACCTGGTGCAGAACAGCAGCAAGATCGACGTGCTGCTGACCCAG
AGCAAGAACCTGGCCGACGTGCTGAAGTTCGCGTTCGACACGCCCTCCGGCGTGCCCTACAACAACCTGAACATCACCAG
CGGCGGCAACGACGGCGCCAAGACCAACGGCCTGGCCGTGACCGGCACCCTGGCCCTGGAGTGGACCCGCCTGAGCGAC
CTGACCGGCGACACCACCTACGCCGACCTGAGCCAGAAGGCGGAGAGCTACCTGCTGAACCCCCAGCCCAAGAGCGCCG
AGCCCTTCCCCGGCCTGGTGGGCAGCAACATCAACATCTCCAACGGCCAGTTCACCGACGCCCAGGTGTCGTGGAACGGC
GGCGACGACAGCTACTACGAGTACCTGATCAAGATGTACGTGTACGACCCCAAGCGCTTCGGCCTGTACAAGGACCGCTG
GGTGGCCGCCGCCCAGAGCACCATGCAGCACCTGGCGAGCCACCCCTCGTCCCGCCCCGACCTGACCTTCCTGGCCAGCT

ACAACAACGGCACCCTGGGCCTGAGCAGCCAGCACCTGACGTGCTTCGACGGCGGCTCCTTCCTGCTGGGCGGCACCGTG
CTGAACCGCACCGACTTCATCAACTTCGGCCTGGACCTGGTGAGCGGCTGCCACGACACCTACAACTCCACCCTGACCGGC
ATCGGCCCCGAGAGCTTCTCCTGGGACACCAGCGACATCCCCAGCAGCCAGCAGAGCCTGTACGAGAAGGCCGGCTTCTA
CATCACCTCCGGCGCCTACATCCTGCGCCCCGAGGTGATCGAGTCCTTCTACTACGCCTGGCGCGTGACCGGCCAGGAGAC
CTACCGCGACTGGATCTGGAGCGCCTTCTCCGCCGTGAACGACTACTGCCGCACGAGCTCCGGCTTCAGCGGCCTGACCG
ACGTGAACGCCGCCAACGGCGGCAGCCGCTACGACAACCAGGAGAGCTTCCTGTTCGCCGAGGTGATGAAGTACAGCTA
CATGGCCTTCGCCGAGGACGCGGCCTGGCAGGTGCAGCCCGGCAGCGGCAACCAGTTCGTGTTCAACACGGAGGCCCAC
CCGGTGCGCGTGAGCAGCACCGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGCACGACGAGCTGTAA

d) Séquence TrMan optimisée avec Tag-c-Myc (rose) et peptide signal HDEL (jaune)

ATGCGCTTCCCCAGCTCCAGCGTGCTGGCCCTGGGCCTGATCGGCCCCGCCCTGGCCTACCCCAAGCCCGGCGCCACCAAG
CGCGGCAGCCCCAACCCCACCCGCGCCGCCGCCGTGAAGGCCGCCTTCCAGACCAGCTGGAACGCCTACCACCACTTCGC
CTTCCCCCACGACGACCTGCACCCCGTGAGCAACTCCTTCGACGACGAGCGCAACGGCTGGGGCTCCTCCGCCATCGACG
GCCTGGACACCGCCATCCTGATGGGCGACGCCGACATCGTGAACACCATCCTGCAGTACGTGCCGCAGATCAACTTCACCA
CCACCGCCGTGGCGAACCAGGGCAGCAGCGTGTTCGAGACCAACATCCGCTACCTGGGCGGCCTGCTGAGCGCCTACGAC
CTGCTGCGCGGCCCCTTCAGCTCCCTGGCCACCAACCAGACCCTGGTGAACAGCCTGCTGCGCCAGGCCCAGACCCTGGCC
AACGGCCTGAAGGTGGCGTTCACCACCCCCTCCGGCGTGCCCGACCCCACCGTGTTCTTCAACCCCACCGTGCGCCGCTCC
GGCGCCAGCAGCAACAACGTGGCCGAGATCGGCAGCCTGGTGCTGGAGTGGACCCGCCTGAGCGACCTGACCGGCAACCC
CCCAGTACGCCCAGCTGGCGCAGAAGGGCGAGAGCTACCTGCTGAACCCCAAGGGCAGCCCCGAGGCCTGGCCCGGCCT
GATCGGCACCTTCGTGAGCACCTCCAACGGCACCTTCCAGGACAGCAGCGGCAGCTGGAGCGGCCTGATGGACAGCTTCT
ACGAGTACCTGATCAAGATGTACCTGTACGACCCCGTGGCCTTCGCCCACTACAAGGACCGCTGGGTGCTGGGCGCCGAC
AGCACCATCGGCCACCTGGGCAGCCACCCCTCCACCCGCAAGGACCTGACCTTCCTGAGCTCCTACAACGGCCAGTCCACC
TCCCCCAACAGCGGCCACCTGGCCAGCTTCGGCGGCGGCAACTTCATCCTGGGCGGCATCCTGCTGAACGAGCAGAAGTA
CATCGACTTCGGCATCAAGCTGGCCAGCAGCTACTTCGGCACCTACACCCAGACCGCCTCGGGCATCGGCCCGGAGGGCT
TCGCCTGGGTGGACAGCGTGACCGGCGCGGGCGGCAGCCCCCCCAGCAGCCAGAGCGGCTTCTACAGCAGCGCCGGCTT
CTGGGTGACCGCCCCCTACTACATCCTGCGCCCCGAGACCCTGGAGTCCCTGTACTACGCCTACCGCGTGACCGGCGACAG
CAAGTGGCAGGACCTGGCCTGGGAGGCGCTGTCGGCCATCGAGGACGCCTGCCGCGCCGGCAGCGCCTACAGCAGCATC
AACGACGTGACCCAGGCGAACGGCGGCGGCGCCAGCGACGACATGGAGAGCTTCTGGTTCGCCGAGGCCCTGAAGTACG
CCTACCTGATCTTCGCCGAGGAGAGCGACGTGCAGGTGCAGGCCACCGGCGGCAACAAGTTCGTGTTCAACACCGAGGCC
CACCCCTTCTCCATCCGCAGCAGCTCCCGCCGCGGCGGCCACCTGGCGGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGCA
CGACGAGCTGTAA

2) Clonage des séquences dans le vecteur Puc57

Afin de pouvoir générer les séquences optimisées dans un vecteur plasmidique, ces dernières ont été modifiées par l'ajout des sites de restriction XhoI et BamHI sur leurs extrémités et ont été clonées par restriction en XhoI/BamHI dans le vecteur plasmidique Puc57, possédant une résistance à l'ampicilline. Toutes ces étapes de synthèse et de clonage ont été réalisés par la société Genecust.

3) Digestion par enzyme de restriction des plasmides

La digestion enzymatique des plasmides a été effectuée par l'utilisation d'une unité de chacune des enzymes de restriction XhoI et BamHI (Promega) en présence d'ADN plasmidique. La digestion a été effectuée dans un tampon Buffer B 1X (Promega) pendant 2 h à 37°C. Les séquences ont ensuite été séparées du plasmide par migration de la digestion sur

gel d'agarose 0,8 % TAE 0,5X avec 5 µM Safeview, puis excisés du gel avec un scalpel sous UV. Les ADNs codant TbGnT I, TbGnT II, AsManHDEL et TrManHDEL ont finalement été purifiés à l'aide du kit d'extraction de fragment d'ADN (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) selon les instructions du kit. Les fragments purifiés ont, ensuite, été intégrés dans un plasmide avec un promoteur de *C. reinhardtii*.

4) Ligation au vecteur d'expression Pks RBCS2/HSP70A-Lox

Les gènes d'intérêts codant TbGnT I, TbGnT II, AsManHDEL et TrManHDEL ont été insérés dans un vecteur Pks RBCS2/HSP70A-Lox contenant le promoteur RBCS2/HSP70A, promoteur chimérique efficace chez *C. reinhardtii*, ainsi que le terminateur RBCS2.

Pour cela, le plasmide pHSP70A/RBCS2-cEPO **(*Figure 29*)** contenant la séquence codante pour l'érythropoïétine humaine optimisée pour *C. reinhardtii a* été digéré avec les enzymes BamHI/XhoI et purifié sur gel comme décrit au niveau de la section (V. F. 3) afin d'obtenir le plasmide pks-RBCS2/HSP70A linéarisé et purifié.

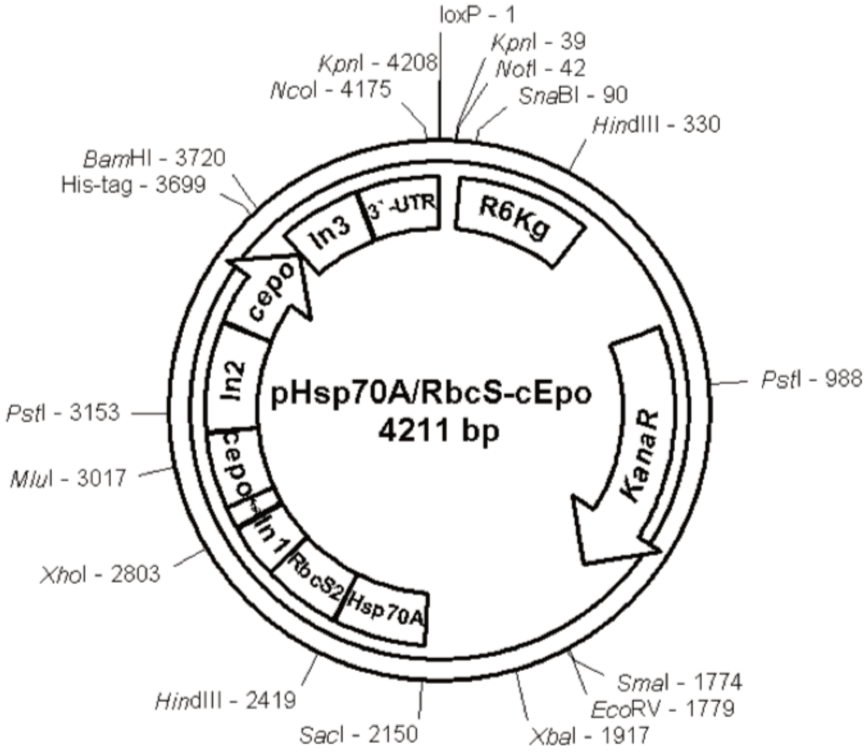


Figure 29 : Plasmide RBCS2/HSP70A-cEPO

Le plasmide RBCS2/HSP70A-cEPO *contient la séquence d'ADNc de l'EPO humaine sous le contrôle du promoteur de la bêta-tubuline de C. reinhardtii b2TUB, avec les intron 1 (In1), de la RBCS2 de C. reinhardtii, coté 5', l'intron 2 (In2) en milieu de séquence et l'intron 3 (In3) coté 3'. Ce plasmide comporte également un site LoxP pour faire de la recombinaison entre deux plasmides possédant cette même séquence et la résistance à la kanamycine.*

Les séquences d'intérêt et le plasmide purifiés ont été mélangées avec 50 ng du vecteur Pks-RBCS2/HSP70A-Lox selon différents rapports insert/vecteur afin d'optimiser la ligation : (1/1) ; (2/1) ;(∞/1). La ligation a été réalisée avec une T4 DNA ligase (Promega) à raison de 3 U pour 10 µL de mélange préparé selon les recommandations du fournisseur. Un volume de 5 µL de produit de ligation a été ensuite transfecté dans des bactéries thermocompétentes PIR1. Après incubation pendant 1 h dans 250 µL de milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolite) sans antibiotique sous 225 rpm et 37°C, 50 µL ont été étalés sur boîte de Pétri contenant du milieu LB (paragraphe II. B) avec 50 µM de Kanamycine (Kanamycine monosulphate, Duchefa Biochimie).

5) Recombinaison Cre/Lox

Les plasmides Pks RBCS2/HSP70A-Lox récupérés des bactéries Pir1 contenant les séquences codant TbGnT I, TbGnT II, AsManHDEL et TrManHDEL ont par la suite été fusionnés avec les plasmides Pks APHVIII-Lox **(*Figure 30*)** et Pks APHVII-Lox **(*Figure 31*)** par recombinaison Cre/Lox. Ces plasmides fournissent, respectivement, la résistance aux antibiotiques, paromomycine et hygromycine, chez *C. reinhardtii* permettant de sélectionner les colonies ayant intégrées le gène d'intérêt.

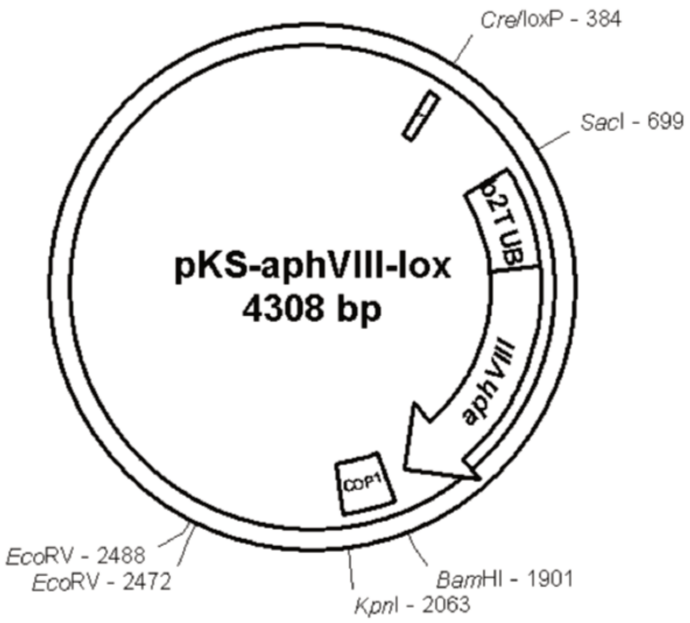


Figure 30 : Carte du vecteur plasmidique Pks APHVIII-lox

Le plasmide pKS-APHVIII-lox contient la cassette APHVIII fournissant la résistance la paromomycine (Heitzer and Zschoernig, 2007). Cette cassette est sous le contrôle du promoteur de la bêta-tubuline de C. reinhardtii b2TUB et comporte également un site LoxP pour faire de la recombinaison entre deux plasmides possédant cette même séquence.

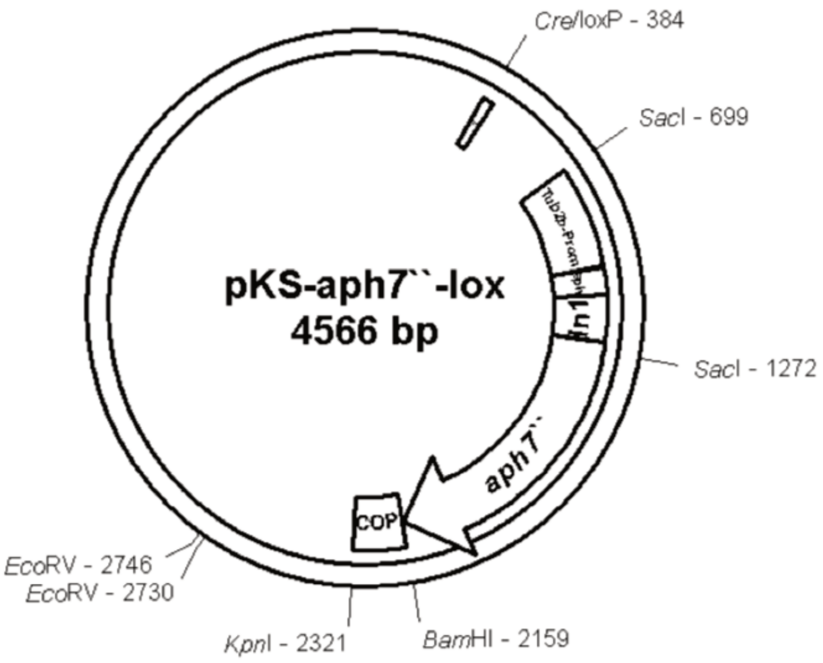


Figure 31 : Carte du vecteur plasmidique Pks APHVII-lox

Le plasmide pKS-APHVII-lox contient la cassette APHVII fournissant la résistance à l'hygromycine (Heitzer and Zschoernig, 2007). Cette cassette est sous le contrôle du promoteur de la bêta-tubuline de C. reinhardtii b2TUB et comporte également un site LoxP pour faire de la recombinaison entre deux plasmides possédant cette même séquence.

La recombinaison Cre/Lox est un outil génétique permettant de contrôler la recombinaison de sites spécifiques de deux plasmides générant, ainsi, un plasmide de fusion. Le système repose sur l'action d'une enzyme appelée Cre recombinase ainsi que sur des séquences d'ADN appelées séquences LoxP composées de deux séquences palindromiques de 13 pb encadrant une séquence asymétrique de 8 pb. Lors de la recombinaison, les séquences LoxP présentes sur chacun des deux plasmides, vont être reconnues au niveau des séquences palindromiques par des Cre recombinases et former des dimères. Ces dimères vont, par la suite, interagir deux à deux, permettant ainsi de positionner, parallèlement, des séquences LoxP de deux plasmides. La Cre recombinase digère, par la suite, les doubles brins d'ADN des deux sites LoxP, puis, une ADN ligase effectue la jonction à l'extrémité de chaque brin LoxP générant ainsi un plasmide unique **(*Figure 32*)**.

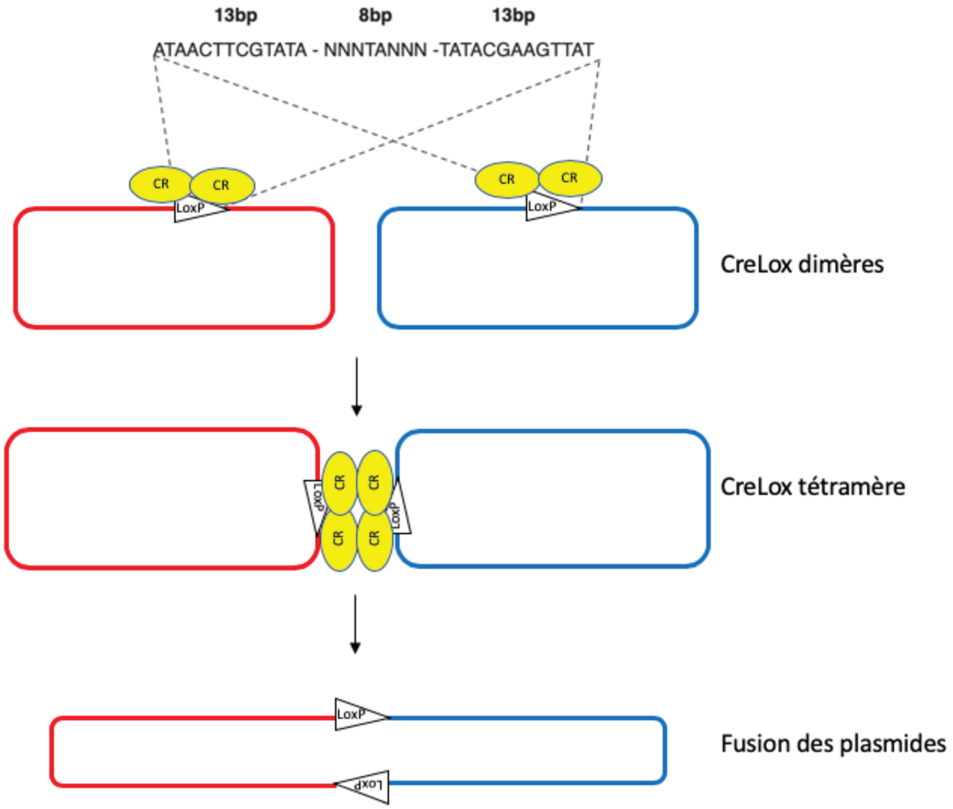


Figure 32 : Schématisation de la recombinaison plasmidique Cre/Lox

LoxP : sequences loxP, CR : Cre recombinase

La recombinaison du plasmide Pks RBCS2/HSP70A avec Pks-APHVIII-Lox (pour TbGnT I et TbGnT II) ou Pks APHVII-Lox (pour AsManHDEL et TrManHDEL) a été effectuée utilisant différents ratios (1/1) (2/1) et (4/1) dans le but de maximiser les chances de succès. Les recombinaisons ont lieu dans un volume total de 50 µL contenant 1 µL d'enzyme Cre recombinase (Biolabs New England 1 000 $U.mL^{-1}$), 5 µL de tampon de réaction 10X (33 mM NaCl ; 50 mM Tris-HCL pH 7,5 ; 10 mM $MgCl_2$) ainsi que les deux ADNs plasmidiques et de l'eau dépourvu de nucléases (Nuclease free water, Fisher) dans le volume restant. Le mélange a ensuite été homogénéisé au vortex et incubé pendant 30 min à 37°C, puis, la réaction a été stoppée par chauffage à 65°C durant 10 min. Un volume de 2 µL à 4 µL des produits de recombinaison a ensuite été utilisé pour transformer la bactérie thermocompétente DH5α comme indiqué en section (IV.H.1). Un volume de 200 µL de produit de transformation a ensuite été étalé sur boîte de Pétri contenant du milieu LB (paragraphe II. B) avec 50 $\mu g.mL^{-1}$ de kanamycine (Kanamycine monosulphate, Duchefa Biochimie) afin de sélectionner les transformations ayant intégrées le plasmide recombiné. Finalement, les plasmides contenant les « TbGnT-likes » Pks TbGT11-V5-RBCS2/HSP70A-APHVIII et Pks TbGT15-HA-RBCS2/HSP70A-

APHVIII (***Figure 33***) ainsi que les plasmides contenant les mannosidases-HDEL Pks AsManHDEL-c-myc-RBCS2/HSP70A-APHVII et Pks TrManHDEL-c-myc-RBCS2/HSP70A-APHVII (***Figure 34***) ont été, par la suite, transfectés chez *C. reinhardtii*.

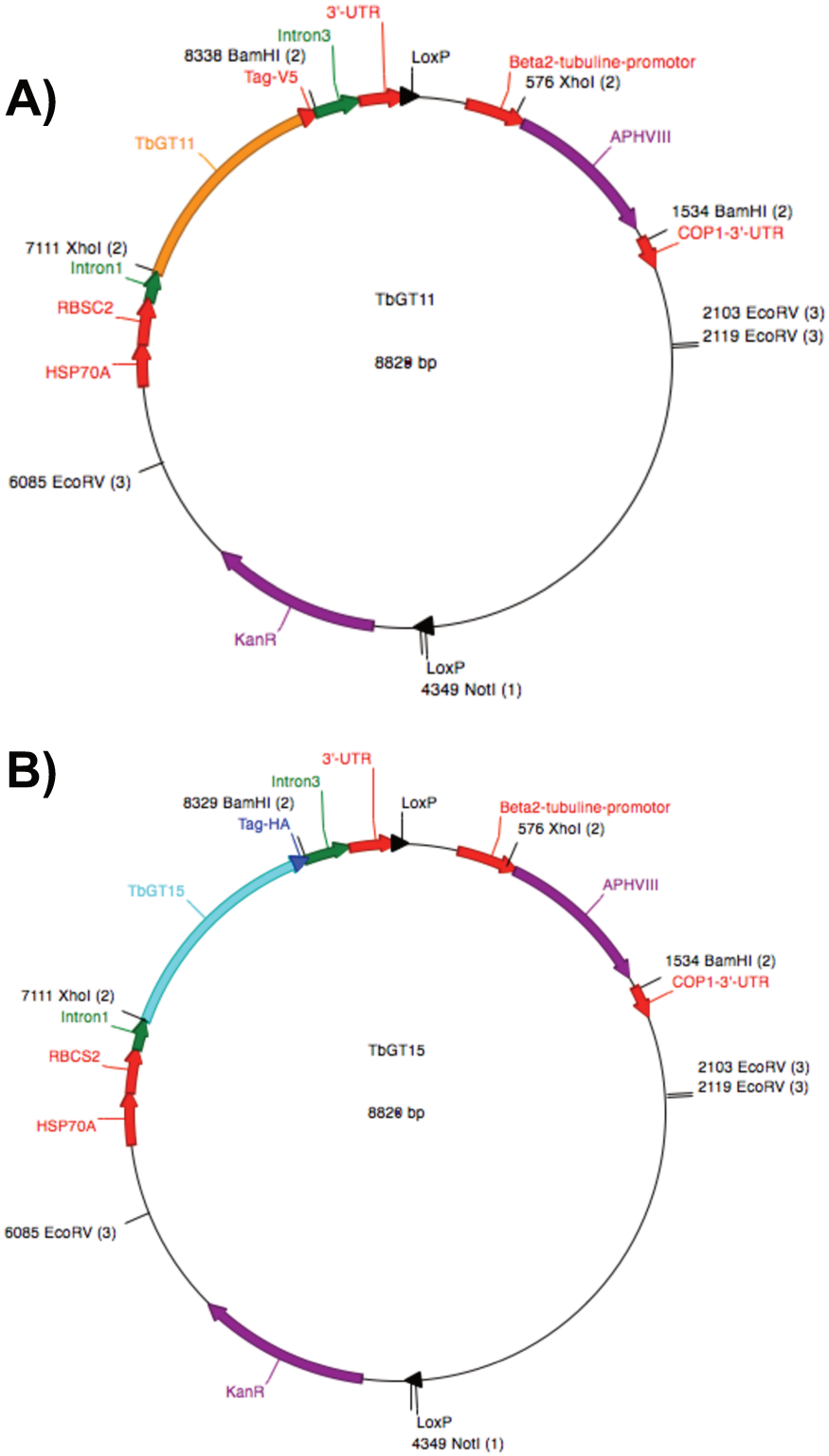


Figure 33 : Plasmide de fusion Pks TbGT11-V5-RBCS2/HSP70A-APHVIII (A) et Pks TbGT15-HA-RBCS2/HSP70A-APHVIII (B)

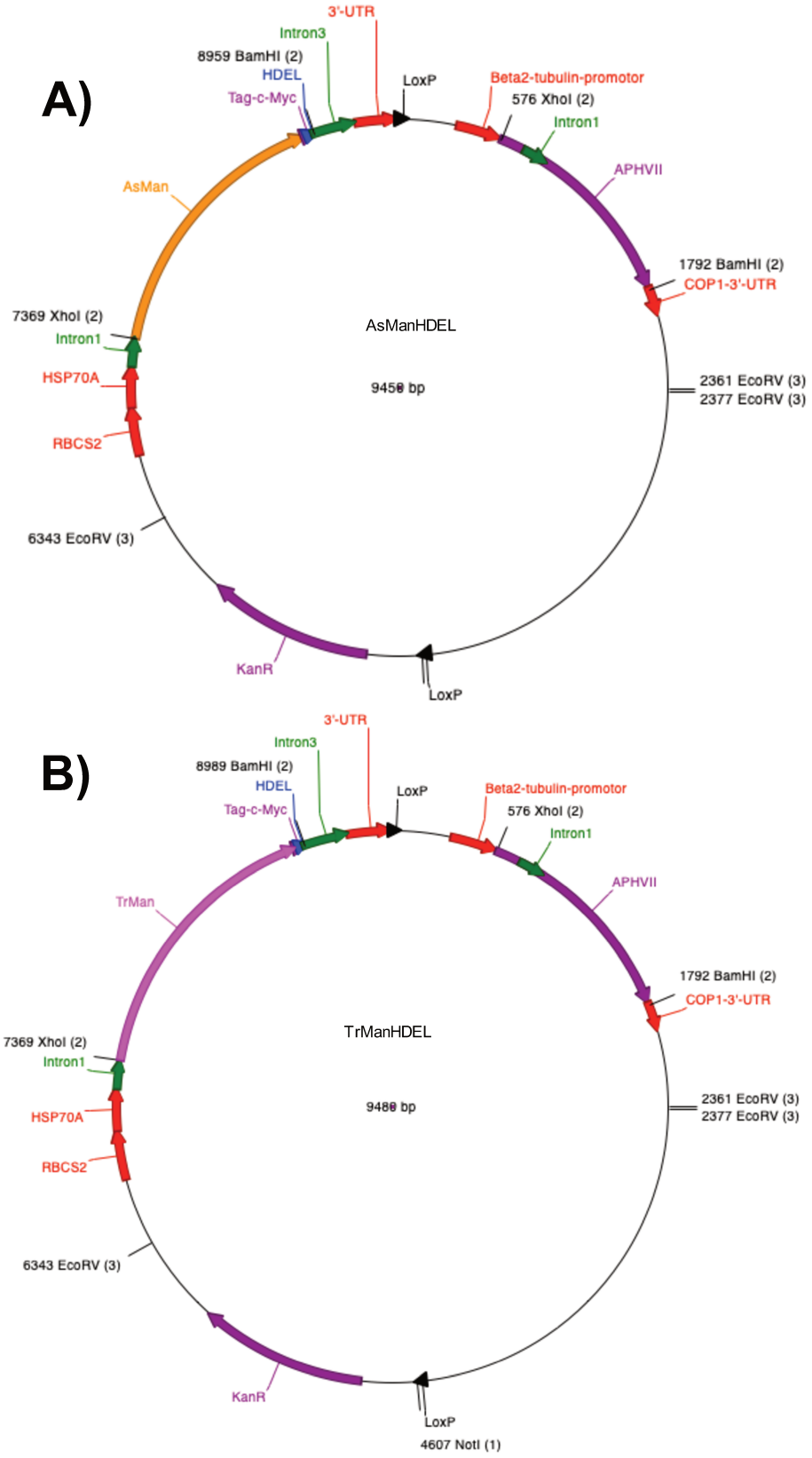


Figure 34 : Plasmide de fusion Pks AsManHDEL-c-myc-RBCS2/HSP70A-APHVII (A) et Pks TrManHDEL-c-myc-RBCS2/HSP70A-APHVII (B)

F) Transformations

1) Transformation de bactéries thermocompétentes DH5α

Un volume de 5 µL d'une solution de plasmide 100 ng.µL^{-1} a été ajouté dans un tube Eppendorf contenant 50 µL de bactéries thermocompétentes DH5alpha (MAX Efficiency™ DH5α Competent Cells, Invitrogen™) placées dans la glace. Les tubes ont ensuite été introduits dans un bain-marie à 42°C pendant 45 secondes, cette étape a pour but d'induire un choc thermique qui va générer l'apparition de pores dans la membrane bactérienne permettant l'introduction du plasmide dans la bactérie. Après cette étape, les échantillons ont immédiatement été placés dans la glace pendant 2 min. Sous la hotte à flux laminaire, 950 µL de milieu LB (paragraphe II. B) sans antibiotique, ont alors été ajoutés aux produits de transformation transférés dans un tube de culture, puis, le mélange a été placé à 37°C pendant 1 h sous une agitation à 220 rpm. Un volume de 200 µL de cultures transformées a été étalé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB (paragraphe II. B) gélosé avec 100 µM d'ampicilline (Ampicilline sulphate, Duchefa Biochimie). Ces boîtes de Pétri ont, finalement, été placées à 37°C pendant 12 h. Les colonies résultantes correspondent à des bactéries ayant acquis la résistance à l'ampicilline, donc, contenant le plasmide.

2) Transformation de plasmide dans la bactérie PIR1

Les produit de ligations, entre les séquences d'intérêts (TbGT11, TbGT15, TrMan, AsMan) et le plasmide Pks-RBCS2/HSP70A-Lox, ont été introduites dans des bactéries thermo-compétentes PIR1(One Shot™ PIR1 Chemically Competent E. coli, Invitrogen™) selon le protocole (One shot PIR1 and PIR2 competent *E.coli*). En résumé, 4 µL de chaque produit de ligation ont été introduits dans des tubes contenant 50 µL de bactéries compétentes PIR1 dans la glace. Les tubes contenant le mélange ont été homogénéisés très délicatement par tapotement avant d'être incubés dans la glace pendant 30 min. Les tubes ont, ensuite, été introduits pendant exactement 30 secondes dans un bain-marie à 42°C sans agitation, puis, les tubes ont, immédiatement, été transférés dans la glace pendant une durée minimum de 2 min. Suite à cela, un volume de 250 µL de milieu SOC (SOC medium, 15544035, Invitrogen) préchauffé à 37°C a été introduit dans chaque tube, sous la hotte stérile. Les tubes ont été incubés pendant 1 h à 37°C sous agitation (225 rpm). Enfin, des volumes de 50 µL et 200 µl de chaque transformation ont été disposés sur des boîtes de Pétri avec de la kanamycine (50 µg.mL^{-1}) (Kanamycine monosulphate, Duchefa Biochimie). Ces boîtes ont été incubées 12 h

dans une étuve à 37°C. Les colonies formées correspondent à des bactéries ayant acquis la résistance à la kanamycine donc contenant le plasmide.

3) Transformation nucléaire de *C. reinhardtii*

Afin d'obtenir des souches exprimant les gènes codant TbGnT I, TbGnT II, AsManHDEL et TrManHDEL, la microalgue *C. reinhardtii* a été transformée avec les différents plasmides selon la technique des billes de verre (Kindle, 1990).

Tout d'abord, 400 mL de culture de microalgues à une concentration cellulaire proche de $2x10^7$ Cellules.mL^{-1} ont été récupérés. Les cellules ont été culotées à 4 000 g pendant 10min. Le culot cellulaire a ensuite été repris dans 4 mL de milieu TAP dans un Erlenmeyer de 100 mL à l'aide cônes coupés. La culture de 4 mL a ensuite été laissée à 25°C sous une lumière continue à 150 μmol(photon).$m^{-2}.s^{-2}$ et sous agitation (150 rpm) pendant 4 h. Pour chaque transformation, 300 μL de culture ont été introduits dans un tube en verre de 15 mL avec 300 mg de billes de verre (Glass Beads Unwashed 425-600 μm, Sigma-Aldrich) préalablement lavés avec de l'acide nitrique, et rincés à l'eau, jusqu'à obtention d'un pH neutre, puis, séchés dans une étuve à 80°C. Ensuite, 100 μL de PEG (Polyéthylène glycol) 20% (filtré 0,22 μm) et 4 μg de plasmide linéarisé sont ajoutés dans le tube. Les 4 μg de plasmide ont été préalablement linéarisés avec l'enzyme EcoRV (Promega, R6351) dans un volume total de 50 μL contenant 2 μL d'enzyme EcoRV (10 U.μL^{-1}), 0,8 μL de BSA acétylé (10 μg.μL^{-1}) et 8 μL de tampon D 10X (60 mM Tris-HCl pH 7,9 ; 1,5 mM NaCl ; 60 mM $MgCl_2$; 10 mM DTT ; Promega R00A4) à 37°C pendant 4 h. Les tubes contenant le mélange de transformation ont ensuite été homogénéisés par vortex durant 20 sec à vitesse maximum.

Les produits de transformation ont été récupérés à l'aide de cônes Eppendorf coupés et introduits dans un Erlenmeyer dans 20 mL de TAP. Les Erlenmeyers contenant les transformations ont été incubées à l'obscurité dans une étuve à 25°C sous agitation (150 rpm) pendant une nuit. Ensuite, les transformations ont été récupérées et centrifugées à 2 500 g pendant 5 min. Le surnageant a été éliminé et les culots ont été repris dans 600 μL de TAP, puis, déposés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu TAP gélosé ainsi que l'antibiotique paromomycine à 15 μg.mL^{-1}. Les boîtes ont été incubées dans l'armoire de culture sous lumière continue à 150 μmol(photon).$m^{-2}.s^{-2}$ à 25°C, jusqu'à l'apparition de colonies.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

I) Conclusions

Les biomédicaments sont des substances biologiques thérapeutiques provenant d'organismes vivants qui sont très différents des autres médicaments obtenus par synthèse chimique. La demande croissante d'utilisation de ces biomolécules à pousser les chercheurs à les produire toujours en plus grande quantité. Avec les innovations du génie génétique comme l'ADN recombinant, ces biomédicaments sont aujourd'hui produits sous forme de protéines recombinantes dans des organismes vivants comme les bactéries, les levures, les cellules de mammifères et plus récemment les plantes (Walsh, 2018). Beaucoup de ces protéines recombinantes sont des protéines ayant des modifications post-traductionnelles, tel que la *N*-glycosylation. La présence et la structure des *N*-glycannes sont essentielles pour la stabilité et la fonction thérapeutique des protéines recombinantes (Li and d'Anjou, 2009; Lingg et al., 2012).

La *N*-glycosylation est un processus de modification des protéines co- et post-traductionnelle initié dans le RE, où un précurseur oligosaccharidique identique pour la grande majorité des cellules eucaryotes va être transféré sur une protéine en cours de synthèse, puis, modifié sous forme de *N*-glycannes oligomannosidiques avant que la glycoprotéine soit adressée vers l'appareil de Golgi (Burda and Aebi, 1999). A la différence du RE, les modifications des *N*-glycannes opérées dans l'appareil de Golgi aboutissent à des structures très différentes en fonction des organismes considérés à cause de la présence ou absence de certaines glycosyltransférases et glycosidases dans l'appareil de Golgi (Wang et al., 2015; Varki, 2017). Pour l'heure, les processus de *N*-glycosylation chez les mammifères, levures et plantes ont été très bien étudiés, ce qui a, notamment, permis d'optimiser la production de glycoprotéines recombinantes dans ces différents systèmes d'expression (Shaaltiel et al., 2007; Meehl and Stadheim, 2014). Plus récemment, la communauté scientifique a commencé à s'intéresser aux microalgues comme systèmes alternatifs de production de protéines recombinantes. Cet intérêt est notamment dû aux nombreux avantages apportés par ces organismes comme, par exemple, la rapidité de croissance et le faible coût de culture (Brennan and Owende, 2010; Eichler-Stahlberg et al., 2009; Dauvillée et al., 2010; Hempel and Maier, 2012; Barrera and Mayfield., 2013; Rasala and Mayfield., 2015; Hempel et al., 2017; Vanier et al., 2018).

L'étude des voies de *N*-glycosylation de deux microalgues, *C. reinhardtii* et *P. tricornutum*, ont récemment été investis, mettant en avant des processus de *N*-glycosylation différents entre les deux microalgues. Le travail de thèse décrit dans ce manuscrit a eu pour objectifs de continuer l'étude de la *N*-glycosylation chez ces deux espèces, d'une part, et plus particulièrement chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et, d'autre part, d'amorcer chez *C. reinhardtii* l'humanisation de la *N*-glycosylation au sein de cet organisme pour en faire une plateforme/système de production de glycoprotéines à intérêt thérapeutique.

A) Réévaluation de la voie de *N*-glycosylation de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* suite à une tentative d'humanisation par expression hétérologue de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I).

Des travaux antérieurs se sont intéressées à la caractérisation des voies de *N*-glycosylation de *C. reinhardtii* et *P. tricornutum*. Ces études ont permis de montrer que la microalgue verte *C. reinhardtii* est dotée d'un mécanisme de *N*-glycosylation aboutissant à une majorité de structures oligomannosidiques allant de $Man_2GlcNAc_2$ à $Man_5GlcNAc_2$, ainsi qu'environ 30% de *N*-glycannes complexes portant 1 ou 2 résidus xylose et des groupements méthyles (Mathieu-Rivet et al., 2013, 2014). De plus, ces analyses ont révélé qu'aucun résidu GlcNAc n'était ajouté en position terminale sur le $Man_5GlcNAc_2$, montrant ainsi que cette microalgue utiliserait un processus de *N*-glycosylation indépendant de la GnT I. Les résultats sont différents pour *P. tricornutum*. En effet, les *N*-glycannes matures de cette microalgue ne semblent pas présenter de résidus xylose et de méthyles mais présentent des *N*-glycannes paucimannosiques portant des résidus fucose (Baïet et al., 2011 ; Zhang et al., 2019). De plus, les analyses bioinformatiques sur le génome nucléaire indiquent la présence d'une GnT I putative bien qu'aucun *N*-glycanne possédant de GlcNAc terminale n'ait été détecté (Baïet et al., 2011). L'activité GnT I de cette protéine de *P. tricornutum* a été confirmée par complémentation dans les cellules mutantes CHO Lec1, dépourvues d'activité GnT I endogène (Baïet et al., 2011).

Chez les mammifères, comme chez l'Homme, la GnT I est une enzyme clé pour la formation des *N*-glycannes complexes. En effet, l'ajout de GlcNAc en $\beta(1,2)$ sur le motif $Man_5GlcNAc_2$, conduisant à la formation du $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$, est une étape cruciale pour

que les autres glycosyltransférases, assurant la formation de *N*-glycannes complexes, puissent agir et aboutir à la formation de *N*-glycannes galactosylés et sialylés.

Etant donné que les deux microalgues *C. reinhardtii* et *P. tricornutum* ne possèdent pas de $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$, la production de protéines recombinantes ne pourra être envisagé que si ces espèces transfèrent correctement un motif β(1,2)-GlcNAc en position terminale sur leurs *N*-glycannes (Mathieu-Rivet et al., 2014). Pour la diatomée *P. tricornutum*, au vue de l'existence d'une GnT I endogène, il a été proposé que cette microalgue ait une voie de *N*-glycosylation GnT I dépendante, mais que le GlcNAc serait, par la suite, retiré par une HexNAcase après l'action de la Man II, formant ainsi l'espèce paucimannosidique $Man_3GlcNAc_2$ (Baïet et al., 2011).

Quant à la microalgue verte *C. reinhardtii*, le problème est tout autre car aucun transfert de β(1,2)-GlcNAc n'a été détecté et aucune séquence putative de GnT I n'a également été identifiée (Mathieu-Rivet et al., 2013). Comme cette microalgue utilise une voie de *N*-glycosylation indépendante à la GnT I, l'humanisation des *N*-glycannes ne pourra se faire que par complémentation hétérologue avec une séquence codant pour une activité GnT I (Mathieu-Rivet et al., 2014).

Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse fut de s'intéresser à l'introduction d'une activité GnT I hétérologue chez *C. reinhardtii*. Pour se faire, deux séquences génétiques codant pour une activité GnT I ont été introduites dans le génome nucléaire d'une souche sauvage de *C. reinhardtii*. Ces deux GnT I provenaient, respectivement, de la plante *A. thaliana* (AtGnT I) et de la microalgue *P. tricornutum* (PtGnT I). Après sélection par PCR des transformants, les analyses des ARNs par RT-PCR, ont permis d'isolé certains candidats exprimant les gènes codant pour la GnT I. La GnT I a pu ensuite être immunodetectée dans la fraction microsomale des transformants, laissant présager une localisation dans l'appareil de Golgi comme cela est le cas chez *A. thaliana* et chez *P. tricornutum* (Dirnberger et al., 2002; Zhang et al., 2019). L'analyse des *N*-glycannes provenant des protéines totales des transformants PtGnT I et AtGnT I par spectrométrie de masse, n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives avec les *N*-glycannes de la souche sauvage de *C. reinhardtii*. Ce résultat a montré que les GnT I introduites ne semblaient pas impacter le

processus de la *N*-glycosylation de la microalgue. Pour expliquer ce résultat, plusieurs hypothèses ont été formulées.

Tout d'abord, la question de l'existence d'un transporteur d'UDP-GlcNAc dans l'appareil de Golgi s'est posée. L'activité de ce transporteur étant nécessaire pour le transport d'UDP-GlcNAc au niveau de l'appareil de Golgi, son absence justifierait l'inaction de la GnT I sur les *N*-glycannes de *C. reinhardtii*. Par ailleurs, une étude bioinformatique réalisée sur le génome de *C. reinhardtii* et cherchant à identifier des séquences putatives de transporteurs de nucléotides sucre (NST) a permis d'identifiés 23 candidats potentiels (Mathieu-Rivet et al., 2017). Actuellement, aucun de ces candidats n'a pu spécifiquement être identifié comme étant un transporteur de GlcNAc. En effet, les NST transportent souvent différents substrats. Des analyses biochimiques complémentaires seront, donc, nécessaires pour identifier l'existence d'un tel transporteur chez *C. reinhardtii.* Il serait notamment intéressant de purifier des vésicules golgiennes et mesurer le transport d'UDP-GlcNAc*.*

Il a également été proposé que *C. reinhardtii* synthétiserait un précurseur glycannique différent de celui des mammifères. Cette proposition repose sur le fait que quatre séquences d'ALG (3, 9, 10 et 12), essentielles à la formation du précurseur glycannique dans le RE, n'ont clairement pas été identifiées lors de ces analyses bioinformatiques (Mathieu-Rivet et al., 2013). L'absence de ces enzymes conduirait à la synthèse d'un précurseur tronqué $Glc_2Man_5GlcNAc_2$ différent du $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. La structure de ce précurseur oligosaccharidique a été analysée en détail dans le 2ème chapitre de ce travail de thèse.

Parallèlement, des analyses complémentaires menées par ESI-MS^n sur le glycanne $Man_5GlcNAc_2$ ont pu montrer que la structure de ce *N*-glycanne était linéaire à la différence du $Man_5GlcNAc_2$ des mammifères dotés d'une structure dite « branchée ». Ces différences structurales ont été confirmées par une approche de mobilité ionique ESI-IMS-MS, montrant que le $Man_5GlcNAc_2$ avait une mobilité différente du $Man_5GlcNAc_2$ branché. Par la suite, une digestion enzymatique à l'α(1,2)-mannosidase a également confirmé la structure linéaire du $Man_5GlcNAc_2$ chez *C. reinhardtii*.

Toutes ces analyses ont permis de réévaluer la voie de *N*-glycosylation de *C. reinhardtii,* qui possèderait une voie « tronquée » au niveau de la synthèse du précurseur conduisant à un *N*-glycanne linéaire dans l'appareil de Golgi (Garénaux et al., 2008). En effet, au vu de

l'absence des ALG 3, 9 et 12 et des résultats obtenus dans le chapitre 2, cette microalgue synthétiserait un $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ au niveau du RE. Ce précurseur, après transfert sur les protéines et retrait des glucoses lors du contrôle qualité, formerait par la suite un $Man_5GlcNAc_2$ linéaire modifié orné de résidus xyloses et groupements méthyles. Le *N*-glycanne $Man_5GlcNAc_2$ de *C. reinhardtii* étant linéaire, ce dernier ne peut pas être substrat pour la GnT I. En effet, la GnT I transférant un GlcNAc sur le mannose lié en α(1,3) ne peux pas agir sur le glycanne de *C. reinhardtii*, ce mannose en α(1,3) étant déjà lié aux deux α(1,2)-mannoses formant l'antenne « a ». Cette différence structurale explique l'absence de transfert de GlcNAc en position terminale sur les *N*-glycannes des souches transformées à la GnT I de *C. reinhardtii.*

B) Etude des précurseurs oligosaccharidiques liés au dolichol par spectrométrie de masse chez les microalgues, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornutum*.

L'étude du précurseur oligosaccharidique est une étape souvent délaissée au profit de l'étude des *N*-glycannes complexes formés dans l'appareil de Golgi. En effet, à la différence des *N*-glycannes complexes prenant des formes très variées selon les organismes, le précurseur oligosaccharidique a très longtemps été considéré comme très conservé parmi les organismes eucaryotes (Burda and Aebi, 1999). Grace à des études récentes sur des organismes unicellulaires comme *T. gondii, C. parvum* et dernièrement *C. reinhardtii,* il a été mis en avant que la conservation du précurseur n'était pas toujours respectée, et que certains organismes pouvaient synthétiser un précurseur « tronqué » dont la structure pourrait impacter la suite des étapes de *N*-glycosylation (Garénaux et al., 2008; Haserick et al., 2017; Vanier et al., 2017). Récemment, des analyses bioinformatiques réalisées sur *P. tricornutum* n'ont pas permis d'identifier l'ALG10 et la glucosidase I (Baïet et al., 2011; Mathieu-Rivet et al., 2014). Pour rappel, la glucosidase I est l'enzyme du contrôle qualité dont l'action principale est le retrait du résidu glucose ajouté par l'ALG10. Si ces prédictions se révèlent exactes, *P. tricornutum* synthétiserait un précurseur tronqué de type $Glc_2Man_9GlcNAc_2$présentant une absence du 3ème résidu glucose en position terminale.

Dans le but d'établir un protocole d'extraction et de caractérisation des précurseurs oligosaccharidiques pour différentes espèces de microalgues, le protocole développé pour *C.*

reinhardtii basé, à la fois, sur une approche d'extraction biochimique et de caractérisation par spectrométrie de masse a été proposé comme une approche performante d'identification de la structure des précurseurs des microalgues. Le protocole a été, dans un premier temps, appliqué sur le sauvage et deux souches mutantes de *C. reinhardtii* (XTA et XTB), mutées au niveau de deux xylosyltransférases golgiennes putatives. Cette analyse a été effectuée afin de valider le protocole d'extraction. Dans un deuxième temps, le protocole a été appliqué sur *P. tricornutum* afin d'identifier pour la première fois la structure de son précurseur oligosaccharidique.

Les résultats de l'étude, ont d'abord, permis de valider le protocole et l'approche analytique mis en place en confirmant que les précurseurs extraits des sauvages et des mutants de *C. reinhardtii* présentaient un oligosaccharide précurseur identique composé de huit hexoses et deux GlcNAcs. Concernant les analyses du précurseur de *P. tricornutum*, les résultats obtenus par MALDI-TOF-MS ont identifié comme ion majoritaire une structure oligosaccharidique composé de onze hexoses et deux GlcNAcs. Cette structure a par la suite été fragmentée par ESI-MS^n, ce qui a permis d'établir qu'il s'agissait d'une structure tri-antennée. D'autres fragments obtenus ont également montré qu'une partie était composée de 6 hexoses linéaires identifiée comme l'antenne « a », tandis que la fragmentation d'une deuxième partie composée de 5 hexoses était branchée et a été identifiée comme étant les antennes « b » et « c ». La synthèse de ces analyses couplée aux données bioinformatiques a permis d'établir que *P. tricornutum* synthétiserait un précurseur de type $Glc_2Man_9GlcNAc_2$, ce qui confirme l'absence de l'ALG10 au sein de cette espèce.

Grâce à la mise en place de ce protocole d'extraction couplé à des approches de caractérisation structurale par spectrométrie de masse, il a été possible de caractériser la structure des précurseurs oligosaccharidiques de deux espèces de microalgues éloignées phylogénétiquement (Chlorophyta *vs* Bacillariophyta). Ces résultats permettent de valider la méthode et de supposer que ce protocole pourrait être employer pour l'extraction et la caractérisation de précurseurs appartenant à d'autres espèces de microalgues. Une telle étude permettrait de comprendre l'évolution du précurseur oligosaccharidique en fonction des espèces.

C) Chapitre III : Caractérisation de la xylosylation des *N*-glycannes chez *Chlamydomonas reinhardtii* par des approches multiples de spectrométrie de masse sur des mutants d'insertion.

Les études des voies de *N*-glycosylation chez *C. reinhardtii* ont révélé que les *N*-glycannes de cette microalgue étaient composés de *N*-glycannes oligomannosidiques et de *N*-glycannes complexes portant un ou deux résidus xyloses ainsi que des groupements méthyles (Mathieu-Rivet et al., 2013). Si la xylosylation des *N*-glycannes a déjà été montrée chez les plantes comme possédant un résidu β(1,2)-xylose sur le mannose du core (Lerouge et al., 1998; Strasser et al., 2000), cet évènement n'existe pas au niveau du processus de *N*-glycosylation humaine (Stanley et al., 2015). L'immunogénicité potentielle des protéines recombinantes produites dans les plantes possédant des épitopes β(1,2)-xylose est toujours sujet à controverse (Bardor et al., 2003; Altmann, 2007; Ward et al., 2014; Tandan et al., 2017). Néanmoins, afin d'éviter tout risque d'immunogénicité, il a été jugé préférable de retirer les xyloses présents sur les *N*-glycannes de *C. reinhardtii* avant d'envisager toute production de protéines recombinantes dans cet organisme.

Chez *C. reinhardtii*, un premier résidu xylose serait lié en β(1,2) sur le mannose du core comme c'est le cas chez les plantes, et le deuxième serait lié sur la chaîne de mannose linéaire (Mathieu-Rivet et al., 2014, 2013; Vanier et al., 2017). Par des analyses bioinformatiques du génome de *C. reinhardtii*, il a été possible d'identifier deux séquences codantes pour des xylosyltransférases putatives nommé XTA et XTB. Récemment, Schulze et collaborateurs ont cherché à caractériser l'activité XTA par approche de mutants d'insertion couplée à des analyses glycoprotéomiques (Schulze et al., 2018). Les résultats ont permis de mettre en avant, d'une part, l'activité xylosyltransférase de XTA sur le core glycannique et, d'autre part, la présence résiduel de xylose sur les *N*-glycannes de mutants XTA suggérant l'activité d'une autre xylosyltransférase potentielle nommée XTB (Schulze et al., 2018).

Durant ces travaux de thèse, l'implication de XTA et XTB dans la xylosylation de *C. reinhardtii* a été investie en étudiant les profils des *N*-glycannes de mutants d'insertion IM_{XTA}, IM_{XTB} ainsi que du double mutant IM_{XTA}xIM_{XTB} par des approches de Western Blot, de spectrométrie de masse (LC-ESI-MS, $ESI\text{-}MS^n$) et de mobilité ionique ($IMS\text{-}MS^2$).

Les résultats ont, tout d'abord, montré que les *N*-glycannes de IM_{XTA}, IM_{XTB} et $IM_{XTA}xIM_{XTB}$ présentaient une grande réduction des espèces xylosylées, confirmant la forte implication de XTA et XTB dans la xylosylation des *N*-glycannes de *C. reinhardtii*. Les résultats du Western Blot réalisé en utilisant un anticorps spécifiquement dirigé contre le β(1,2)-xylose du core glycannique ont montré une forte diminution du marquage sur les protéines du mutant IM_{XTA} confirmant ainsi que XTA serait une β(1,2)-xylosyltransférase du core et XTB serait responsable du transfert du deuxième xylose. Cependant, comme la diminution du marquage a été plus forte au niveau du double mutant $IM_{XTA}IM_{XTB}$ par rapport au simple mutant IM_{XTA}, il n'est pas exclu que XTB soit également capable de transférer du β(1,2)-xylose sur le core glycannique.

Les analyses d'ESI-MS^n est d'IMS-MS^2 ont, par la suite, permis de mettre en avant que le deuxième xylose pouvait se retrouver à deux positions différentes, soit sur le premier α(1,2)-mannose, soit sur l'α(1,3)-mannose de la branche. Il a ainsi été montré que l'α(1,2)-mannose était uniquement présent si le β(1,2)-xylose du core l'était également alors que le xylose sur l'α(1,3)-mannose pouvait se retrouver dans les espèces monoxylosylées au même titre que le β(1,2)-xylose. Les résultats d'ESI-MS^n sur le double mutant $IM_{XTA}xIM_{XTB}$ ont finalement montré que le xylose présent sur les espèces monoxylosylées était uniquement lié à l'α(1,3)-mannose. Il a, donc, été émis l'hypothèse que le xylose lié au niveau de l'α(1,3)-mannose de la branche résulterait de l'action d'une xylosyltransférase autre que XTA ou XTB.

De nouvelles analyses bioinformatiques ont ainsi permis d'identifier trois séquences (Cre10.g458950, Cre13.g588750, Cre08.g361250) qui partagent un domaine *C*-terminal avec XTA, XTB et la β(1,2)-xylosyltransférase des plantes. Ce domaine appartenant à la famille GT61 a déjà été montré comme nécessaire pour l'activité xylosyltransférase (Pagny et al., 2003; Bencúr et al., 2005; Klutts et al., 2007). Ces trois séquences pourraient coder pour d'autres potentielles xylosyltransférases de la *N*-glycosylation chez *C. reinhardtii*.

Cette étude de la xylosylation de *C. reinhardtii* par des analyses de mutants d'insertion a permis de mettre en avant que la xylosylation de cette microalgue était bien différente de celle des plantes. En effet, chez les plantes, le transfert du β(1,2)-xylose sur le core glycannique est dépendant de la présence du motif $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ obtenue par l'action des GnT I, GnT II et mannosidase II, respectivement. Chez *C. reinhardtii*, comme aucune activité GnT I

et/ou GnT II n'est présente, la xylosylation du core s'effectue de manière indépendante à la GnT I par l'action de la XTA majoritairement ainsi que par l'action de XTB dans un second temps. De plus, à la différence des plantes, *C. reinhardtii* possède un deuxième xylose pouvant se retrouvé sur l' α(1,3)-mannose et/ou sur le premier α(1,2)-mannose. XTB a été montré comme responsable de l'ajout du xylose sur l'α(1,2)-mannose dont le transfert nécessite, au préalable, la présence du β(1,2)-xylose sur le core glycannique. Concernant le xylose positionné sur l'α(1,3)-mannose, son transfert a été montré comme indépendant du β(1,2)-xylose du core et serait effectué par une xylosyltransférase différente de XTA et XTB.

I) Perspectives

Au cours de cette thèse, l'ingénierie métabolique de la *N*-glycosylation a été entreprise chez la microalgue verte *C. reinhardtii* pour faire de cet organisme une nouvelle plateforme de production de protéines recombinantes.

Au sein de cette microalgue, les *N*-glycannes sont majoritairement des oligomannosides pouvant porter jusqu'à deux résidus xyloses. Compte-tenu du potentiel immunogène des xyloses sur les *N*-glycannes en thérapie humaine, cette thèse a cherché par une approche de mutation (Knock-out) à diminuer les espèces xylosylées en ciblant deux xylosyltransférases putatives XTA et XTB. Par cette approche, il a été possible de réduire de manière considérable la xylosylation des *N*-glycannes initialement de 30% à environ 6%. Les travaux ont également identifié trois autres potentielles xylosyltransférases pouvant expliquer les 6% de xylose restant. Dans le but de retirer la totalité des xyloses chez *C. reinhardtii,* il serait utile d'inactiver toutes les xylosyltransférases par mutations ou par d'autres approches comme les ARN-antisens ou encore CRISPR/Cas9 (Navarro and Baulcombe, 2019; Shin et al., 2019). De plus, il serait également intéressant d'exprimer des protéines recombinantes lysosomales (glucocérébrosidase, par exemple) au sein du double mutant $IM_{XTA}xIM_{XTB}$ de *C. reinhardtii* où plus de 90% d'oligomannosides composent les *N*-glycannes, et de vérifier si l'adressage de la protéine recombinante au lysosome qui requiert des *N*-glycannes oligomannosidiques sur la protéine s'effectue correctement.

Dans le cadre d'une production de protéines recombinantes nécessitant la présence de *N*-glycannes de mammifères, en plus du retrait des xyloses, d'importants travaux d'ingénierie métabolique restent à effectuer pour envisager une production optimale chez *C.*

reinhardtii. Au cours de cette thèse, les GnT I d'*A. thaliana* et *P. tricornutum* ont été exprimées dans la microalgue verte afin de synthétiser le $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$ essentielle pour entamer l'humanisation des *N*-glycannes. Néanmoins, bien que des clones exprimant la GnT I aient été obtenus, aucun n'a pu transférer de résidu GlcNAc en position terminale sur le $Man_5GlcNAc_2$, glycanne linéaire chez *C. reinhardtii*. Or, comme ce $Man_5GlcNAc_2$ linéaire ne peut pas être utilisé par la GnT I, une autre stratégie d'humanisation de la *N*-glycosylation devra être envisagée pour parvenir à humaniser la *N*-glycosylation de *C. reinhardtii*.

Chez *Trypanosoma brucei*, synthétisant un $Man_5GlcNAc_2$ linéaire identique à celui de *C. reinhardtii*, il a récemment été montré que les *N*-glycannes complexes de cette espèce pouvaient porter des résidus GlcNAc en position terminale sur les *N*-glycannes de type $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$ et de $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$. Le transfert de GlcNAc terminale chez *T. brucei* a été attribué à l'action de deux enzymes transférant, respectivement et de manière indépendante, un résidu GlcNAc sur le mannose en α(1,3) et sur le mannose en α(1,6) (Damerow et al., 2014, 2016). L'expression de ces deux enzymes appelées « GnT-like » chez *C. reinhardtii* par approche de « Knock-in » permettrait de transférer des résidus GlcNAc en position terminale sur les *N*-glycannes et ainsi amorcer l'humanisation des *N*-glycannes de *C. reinhardtii*.

De plus, comme *C. reinhardtii* possède majoritairement des *N*-glycannes oligomanosidiques de type $Man_5GlcNAc_2$ ainsi qu'une très faible quantité de $Man_3GlcNAc_2$, il serait intéressant de chercher à accumuler le motif $Man_3GlcNAc_2$ pour prétendre obtenir une plus grande quantité de $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ sous l'expression des deux « GnT-like ». Il a ainsi été proposé d'exprimer une α(1,2)-mannosidase avec un signal HDEL sur la partie *C*-terminale permettant la rétention de la protéine dans le RE. La rétention de cette enzyme permettrait de digérer plus efficacement le $Man_5GlcNAc_2$ et d'accumuler une plus grande quantité de $Man_3GlcNAc_2$ dans l'appareil de Golgi (Gomord et al., 1997; Callewaert et al., 2001).

Lors de cette thèse, les constructions plasmidiques et l'expression des deux « GnT-like » de *Trypanosoma brucei* ainsi que l'α(1,2)-mannosidase d'*Aspergillus saitoi* et *Trichoderma reesei* intégrant un signal de rétention HDEL ont été amorcées chez *C. reinhardtii* (Cf Matériels et Méthodes). Si ces résultats aboutissent à l'accumulation d'un motif $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$, il serait alors possible d'envisager à l'avenir la poursuite de

l'humanisation du *N*-glycanne de *C. reinhardtii* avec l'expression de la β(1,4)-galactosyltransférase ainsi que les enzymes responsables de la biosynthèse, du transport et du transfert du Neu5Ac (***Figure 35***).

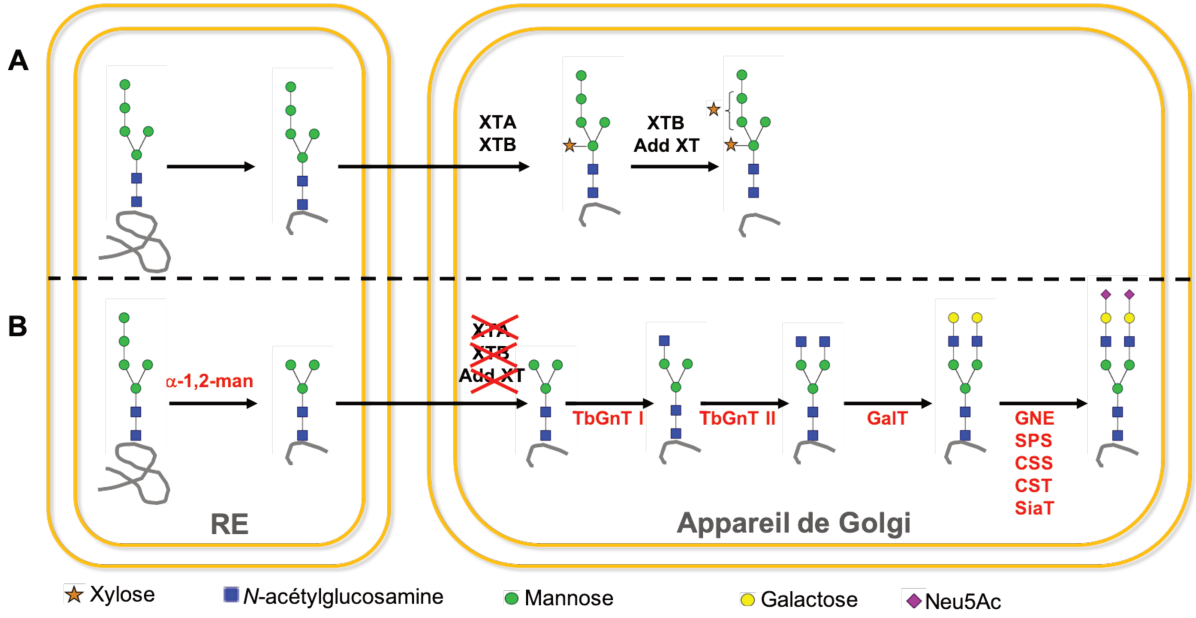


Figure 35 : Schéma bilan des perspectives d'humanisation de la voie de N-glycosylation chez C. reinhardtii.

*A) Représentation de la voie simplifiée de N-glycosylation présente dans la souche sauvage de C. reinhardtii. B) Perspective de modification de la N-glycosylation, avec mutation des xylosyltransférases (XTA, XTB et XT additionnelles) et transformation avec l'α(1,2)-mannosidase (α(1,2)-man) avec un signal HDEL de rétention dans le réticulum endoplasmique (RE), les « GnT likes » de T. brucei TbGnT I et II, la β(1,4)-galactosyltransférase (GalT) et les enzymes responsables de la synthèse, du transport et du transfert du Neu5Ac : la UDP-*N*-acétylglucosamine-2-epimerase/*N*-acétylmannosamine kinase (GNE), la *N*-acétylneuraminate-9-phosphate synthase (SPS), la CMP-acide sialique synthase (CSS), le CMP-acide sialique transporteur (CST), et des sialyltransférases (ST).*

A l'avenir, il sera également indispensable de de caractériser les processus de *O*-glycosylation chez *C. reinhardtii* et *P. tricornutum* pour maximiser l'utilisation de ces organismes comme systèmes alternatifs de production de protéines recombinantes.

Bibliographie

Bibliographie

Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Functional and structural diversity of the endoplasmic reticulum 1833, 2430–2437. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.001

Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., Molinari, M., 2010. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. Trends in Biochemical Sciences 35, 74–82. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.001

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R., 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science 301, 653–657. https://doi.org/10.1126/science.1086391

Altmann, F., 2007. The Role of Protein Glycosylation in Allergy. IAA 142, 99–115. https://doi.org/10.1159/000096114

Baïet, B., Burel, C., Saint-Jean, B., Louvet, R., Menu-Bouaouiche, L., Kiefer-Meyer, M.-C., Mathieu-Rivet, E., Lefebvre, T., Castel, H., Carlier, A., Cadoret, J.-P., Lerouge, P., Bardor, M., 2011. N-Glycans of Phaeodactylum tricornutum Diatom and Functional Characterization of Its N-Acetylglucosaminyltransferase I Enzyme. Journal of Biological Chemistry 286, 6152–6164. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.175711

Bakker, H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Gomord, V., Elbers, I., Stevens, L.H., Jordi, W., Lommen, A., Faye, L., Lerouge, P., Bosch, D., 2001. Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 98, 2899–2904. https://doi.org/10.1073/pnas.031419998

Bakker, H., Rouwendal, G.J.A., Karnoup, A.S., Florack, D.E.A., Stoopen, G.M., Helsper, J.P.F.G., Ree, R. van, Die, I. van, Bosch, D., 2006. An antibody produced in tobacco expressing a hybrid β-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 7577–7582. https://doi.org/10.1073/pnas.0600879103

Ball, S.G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J.-C., Matagne, RenéF., 1990. Physiology of starch storage in the monocellular alga Chlamydomonas reinhardtii. Plant Science 66, 1–9. https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90162-H

Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A.-C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L., Lerouge, P., 2003. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core α(1,3)-fucose and core xylose. Glycobiology 13, 427–434. https://doi.org/10.1093/glycob/cwg024

Bardor, M., Nguyen, D.H., Diaz, S., Varki, A., 2005. Mechanism of Uptake and Incorporation of the Non-human Sialic Acid N-Glycolylneuraminic Acid into Human Cells. J. Biol. Chem. 280, 4228–4237. https://doi.org/10.1074/jbc.M412040200

Barrera, D.J., Mayfield, S.P., 2013. High-value Recombinant Protein Production in Microalgae, in: Handbook of Microalgal Culture. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 532–544. https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch27

Basu, D., Liang, Y., Liu, X., Himmeldirk, K., Faik, A., Kieliszewski, M., Held, M., Showalter, A.M., 2013. Functional Identification of a Hydroxyproline-O-galactosyltransferase Specific for Arabinogalactan Protein Biosynthesis in Arabidopsis. J. Biol. Chem. 288, 10132–10143. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.432609

Bencúr, P., Steinkellner, H., Svoboda, B., Mucha, J., Strasser, R., Kolarich, D., Hann, S., Köllensperger, G., Glössl, J., Altmann, F., Mach, L., 2005. Arabidopsis thaliana β1,2-xylosyltransferase: an unusual glycosyltransferase with the potential to act at multiple stages of the plant N-glycosylation pathway. Biochemical Journal 388, 515–525. https://doi.org/10.1042/BJ20042091

Bennett, E.P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T.A., Fritz, T.A., Tabak, L.A., 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. Glycobiology 22, 736–756. https://doi.org/10.1093/glycob/cwr182

Benyair, R., Ogen-Shtern, N., Mazkereth, N., Shai, B., Ehrlich, M., Lederkremer, G.Z., 2015. Mammalian ER mannosidase I resides in quality control vesicles, where it encounters its glycoprotein substrates. Mol Biol Cell 26, 172–184. https://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1152

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Enzymes: Basic Concepts and Kinetics.

Berlec, A., Štrukelj, B., 2013. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in Escherichia coli, yeasts and mammalian cells. J Ind Microbiol Biotechnol 40, 257–274. https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0

Bickel, T., Lehle, L., Schwarz, M., Aebi, M., Jakob, C.A., 2005. Biosynthesis of Lipid-linked Oligosaccharides in Saccharomyces cerevisiae Alg13p AND Alg14p FORM A COMPLEX REQUIRED FOR THE FORMATION OF GlcNAc2-PP-DOLICHOL. J. Biol. Chem. 280, 34500–34506. https://doi.org/10.1074/jbc.M506358200

Bill, R.M., 2001. Yeast – a panacea for the structure–function analysis of membrane proteins? Curr Genet 40, 157–171. https://doi.org/10.1007/s002940100252

Bollig, K., Lamshöft, M., Schweimer, K., Marner, F.-J., Budzikiewicz, H., Waffenschmidt, S., 2007. Structural analysis of linear hydroxyproline-bound O-glycans of Chlamydomonas reinhardtii—conservation of the inner core in Chlamydomonas and land plants. Carbohydrate Research 342, 2557–2566. https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.08.008

Borys, M.C., Dalal, N.G., Abu-Absi, N.R., Khattak, S.F., Jing, Y., Xing, Z., Li, Z.J., 2010. Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. Biotechnol. Bioeng. 105, 1048–1057. https://doi.org/10.1002/bit.22644

Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otillar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Verret, F., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J.-P., Chiovitti, A., Choi, C.J., Coesel, S., De Martino, A., Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Fournet, J., Haruta, M., Huysman, M.J.J., Jenkins, B.D., Jiroutova, K., Jorgensen, R.E., Joubert, Y., Kaplan, A., Kröger, N., Kroth, P.G., La Roche, J., Lindquist, E., Lommer, M., Martin–Jézéquel, V., Lopez, P.J., Lucas, S., Mangogna, M., McGinnis, K., Medlin, L.K., Montsant, A., Secq, M.-P.O., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J.-L., Porcel, B.M., Poulsen, N., Robison, M., Rychlewski, L., Rynearson, T.A., Schmutz, J., Shapiro, H., Siaut, M., Stanley, M., Sussman, M.R., Taylor, A.R., Vardi, A., von Dassow, P., Vyverman, W., Willis, A., Wyrwicz, L.S., Rokhsar, D.S., Weissenbach, J., Armbrust, E.V., Green, B.R., Van de Peer, Y., Grigoriev, I.V., 2008. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. Nature 456, 239–244. https://doi.org/10.1038/nature07410

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14, 557–577. https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009

Brockhausen, I., 2006. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. EMBO reports 7, 599–604. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400705

Brockhausen, I., 1995. Chapter 5 Biosynthesis 3. Biosynthesis of O-Glycans of the N-Acetylgalactosamine-α-Ser/Thr Linkage Type, in: J. Montreuil, J.F.G.V. and H.S. (Ed.), New Comprehensive Biochemistry, Glycoproteins. Elsevier, pp. 201–259.

Brockhausen, I., Schachter, H., Stanley, P., 2009. O-GalNAc Glycans. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Brockhausen, I., Stanley, P., 2015. O-GalNAc Glycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L.,

Seeberger, P.H. (Eds.), Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Burda, P., Aebi, M., 1999. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1426, 239–257. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00127-5

Burda, P., Aebi, M., 1998. The ALG10 locus of Saccharomyces cerevisiae encodes the α-1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation. Glycobiology 8, 455–462.

Butler, M., 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Appl Microbiol Biotechnol 68, 283–291. https://doi.org/10.1007/s00253-005-1980-8

Butler, M., Spearman, M., 2014. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. Current Opinion in Biotechnology, Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology 30, 107–112. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.010

Callewaert, N., Laroy, W., Cadirgi, H., Geysens, S., Saelens, X., Min Jou, W., Contreras, R., 2001. Use of HDEL-tagged Trichoderma reesei mannosyl oligosaccharide 1,2-α-D-mannosidase for N-glycan engineering in Pichia pastoris. FEBS Letters 503, 173–178. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02676-X

Cantagrel, V., Lefeber, D.J., Ng, B.G., Guan, Z., Silhavy, J.L., Bielas, S.L., Lehle, L., Hombauer, H., Adamowicz, M., Swiezewska, E., De Brouwer, A.P., Blümel, P., Sykut-Cegielska, J., Houliston, S., Swistun, D., Ali, B.R., Dobyns, W.B., Babovic-Vuksanovic, D., van Bokhoven, H., Wevers, R.A., Raetz, C.R.H., Freeze, H.H., Morava, É., Al-Gazali, L., Gleeson, J.G., 2010. SRD5A3 Is Required for Converting Polyprenol to Dolichol and Is Mutated in a Congenital Glycosylation Disorder. Cell 142, 203–217. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.001

Caramelo, J.J., Castro, O.A., Prat-Gay, G. de, Parodi, A.J., 2004. The Endoplasmic Reticulum Glucosyltransferase Recognizes Nearly Native Glycoprotein Folding Intermediates. J. Biol. Chem. 279, 46280–46285. https://doi.org/10.1074/jbc.M408404200

Castilho, A., Gattinger, P., Grass, J., Jez, J., Pabst, M., Altmann, F., Gorfer, M., Strasser, R., Steinkellner, H., 2011. N-Glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans. Glycobiology 21, 813–823. https://doi.org/10.1093/glycob/cwr009

Castilho, A., Strasser, R., Stadlmann, J., Grass, J., Jez, J., Gattinger, P., Kunert, R., Quendler, H., Pabst, M., Leonard, R., Altmann, F., Steinkellner, H., 2010. In Planta Protein Sialylation through Overexpression of the Respective Mammalian Pathway. Journal of Biological Chemistry 285, 15923–15930. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.088401

Chan, K.F., Shahreel, W., Wan, C., Teo, G., Hayati, N., Tay, S.J., Tong, W.H., Yang, Y., Rudd, P.M., Zhang, P., Song, Z., 2016. Inactivation of GDP-fucose transporter gene (Slc35c1) in CHO cells by ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas9 for production of fucose-free antibodies. Biotechnology Journal 11, 399–414. https://doi.org/10.1002/biot.201500331

Chantret, I., Dupré, T., Delenda, C., Bucher, S., Dancourt, J., Barnier, A., Charollais, A., Heron, D., Bader-Meunier, B., Danos, O., Seta, N., Durand, G., Oriol, R., Codogno, P., Moore, S.E.H., 2002. Congenital Disorders of Glycosylation Type Ig Is Defined by a Deficiency in Dolichyl-P-mannose:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl Mannosyltransferase. J. Biol. Chem. 277, 25815–25822. https://doi.org/10.1074/jbc.M203285200

Chavan, M., Yan, A., Lennarz, W.J., 2005. Subunits of the Translocon Interact with Components of the Oligosaccharyl Transferase Complex. J. Biol. Chem. 280, 22917–22924. https://doi.org/10.1074/jbc.M502858200

Chen, F., Johns, M.R., 1996. Heterotrophic growth of Chlamydomonas reinhardtii on acetate in chemostat culture. Process Biochemistry 31, 601–604. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00006-4

Chenu, S., Grégoire, A., Malykh, Y., Visvikis, A., Monaco, L., Shaw, L., Schauer, R., Marc, A., Goergen, J.-L., 2003. Reduction of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase activity in engineered

Chinese hamster ovary cells using an antisense-RNA strategy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1622, 133–144. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00137-5

Cherepanova, N., Shrimal, S., Gilmore, R., 2016. N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. Current Opinion in Cell Biology, Cell organelles 41, 57–65. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.03.021

Chiba, Y., Suzuki, M., Yoshida, S., Yoshida, A., Ikenaga, H., Takeuchi, M., Jigami, Y., Ichishima, E., 1998. Production of Human Compatible High Mannose-type (Man5GlcNAc2) Sugar Chains inSaccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 273, 26298–26304. https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26298

Choi, B.-K., Bobrowicz, P., Davidson, R.C., Hamilton, S.R., Kung, D.H., Li, H., Miele, R.G., Nett, J.H., Wildt, S., Gerngross, T.U., 2003. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast Pichia pastoris. PNAS 100, 5022–5027. https://doi.org/10.1073/pnas.0931263100

Chung, C.H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q.-T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B.A., Satinover, S.M., Hosen, J., Mauro, D., Slebos, R.J., Zhou, Q., Gold, D., Hatley, T., Hicklin, D.J., Platts-Mills, T.A.E., 2008. Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose-α-1,3-Galactose. New England Journal of Medicine 358, 1109–1117. https://doi.org/10.1056/NEJMoa074943

Cipollo, J.F., Trimble, R.B., Chi, J.H., Yan, Q., Dean, N., 2001. The Yeast ALG11 Gene Specifies Addition of the Terminal α1,2-Man to the Man5GlcNAc2-PP-dolicholN-Glycosylation Intermediate Formed on the Cytosolic Side of the Endoplasmic Reticulum. J. Biol. Chem. 276, 21828–21840. https://doi.org/10.1074/jbc.M010896200

Ciucanu, I., Kerek, F., 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydrate Research 131, 209–217. https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8

Cohney, S., F. C. McKenzie, I., Patton, K., Prenzoska, J., Ostenreid, K., L. Fodor, W., S. Sandrin, M., 1997. Down-regulation of Ga1 alpha(1,3)Gal expression by alpha 1,2-fucosyltransferase - Further characterization of alpha 1,2-fucosyltransferase transgenic mice. Transplantation 64, 495–500. https://doi.org/10.1097/00007890-199708150-00020

Couto, J.R., Huffaker, T.C., Robbins, P.W., 1984. Cloning and expression in Escherichia coli of a yeast mannosyltransferase from the asparagine-linked glycosylation pathway. J. Biol. Chem. 259, 378–382.

Cox, K.M., Sterling, J.D., Regan, J.T., Gasdaska, J.R., Frantz, K.K., Peele, C.G., Black, A., Passmore, D., Moldovan-Loomis, C., Srinivasan, M., Cuison, S., Cardarelli, P.M., Dickey, L.F., 2006. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant Lemna minor. Nature Biotechnology 24, 1591. https://doi.org/10.1038/nbt1260

Culling, C.F., Reid, P.E., Dunn, W.L., 1976. A new histochemical method for the identification and visualization of both side chain acylated and nonacylated sialic acids. J Histochem Cytochem 24, 1225–1230. https://doi.org/10.1177/24.12.187689

Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A., Dubois, G., Guyot, V., Perez-Michaut, C., Amato, A., Falciatore, A., Juillerat, A., Beurdeley, M., Voytas, D.F., Cavarec, L., Duchateau, P., 2014. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. Nature Communications 5, 3831. https://doi.org/10.1038/ncomms4831

Dai, Y., Vaught, T.D., Boone, J., Chen, S.-H., Phelps, C.J., Ball, S., Monahan, J.A., Jobst, P.M., McCreath, K.J., Lamborn, A.E., Cowell-Lucero, J.L., Wells, K.D., Colman, A., Polejaeva, I.A., Ayares, D.L., 2002. Targeted disruption of the α1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. Nature Biotechnology 20, 251–255. https://doi.org/10.1038/nbt0302-251

Damerow, M., Graalfs, F., Güther, M.L.S., Mehlert, A., Izquierdo, L., Ferguson, M.A.J., 2016. A gene of the β3-glycosyltransferase family encodes N-acetylglucosaminyltransferase II function in Trypanosoma brucei. Journal of Biological Chemistry jbc.M116.733246. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.733246

Damerow, M., Rodrigues, J.A., Wu, D., Güther, M.L.S., Mehlert, A., Ferguson, M.A.J., 2014. Identification and Functional Characterization of a Highly Divergent N-

Acetylglucosaminyltransferase I (TbGnTI) in Trypanosoma brucei. Journal of Biological Chemistry 289, 9328–9339. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.555029

Dauvillée, D., Delhaye, S., Gruyer, S., Slomianny, C., Moretz, S.E., d'Hulst, C., Long, C.A., Ball, S.G., Tomavo, S., 2010. Engineering the Chloroplast Targeted Malarial Vaccine Antigens in Chlamydomonas Starch Granules. PLOS ONE 5, e15424. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015424

Davidson, R.C., Nett, J.H., Renfer, E., Li, H., Stadheim, T.A., Miller, B.J., Miele, R.G., Hamilton, S.R., Choi, B.-K., Mitchell, T.I., Wildt, S., 2004. Functional analysis of the ALG3 gene encoding the Dol-P-Man: Man5GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransferase enzyme of P. pastoris. Glycobiology 14, 399–407. https://doi.org/10.1093/glycob/cwh023

De Jesus, M., Wurm, F.M., 2011. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Unmet Needs in Protein Formulation Science 78, 184–188. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.005

Demain, A.L., Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology Advances 27, 297–306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

Demurtas, O.C., Massa, S., Ferrante, P., Venuti, A., Franconi, R., Giuliano, G., 2013. A Chlamydomonas-Derived Human Papillomavirus 16 E7 Vaccine Induces Specific Tumor Protection. PLOS ONE 8, e61473. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061473

Dent, R.M., Haglund, C.M., Chin, B.L., Kobayashi, M.C., Niyogi, K.K., 2005. Functional Genomics of Eukaryotic Photosynthesis Using Insertional Mutagenesis of Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiology 137, 545–556. https://doi.org/10.1104/pp.104.055244

Dingermann, T., 2008. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. Biotechnology Journal 3, 90–97. https://doi.org/10.1002/biot.200700214

Dirnberger, D., Bencúr, P., Mach, L., Steinkellner, H., 2002. The Golgi localization of Arabidopsis thaliana beta1,2-xylosyltransferase in plant cells is dependent on its cytoplasmic and transmembrane sequences. Plant Mol. Biol. 50, 273–281.

Donadio-Andréi, S., Iss, C., El Maï, N., Calabro, V., Ronin, C., 2012. Glycoengineering of protein-based therapeutics, in: Pilar Rauter, A., Lindhorst, T. (Eds.), Carbohydrate Chemistry. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 94–123. https://doi.org/10.1039/9781849734769-00094

Dreesen, I.A.J., Hamri, G.C.-E., Fussenegger, M., 2010. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from Staphylococcus aureus infection. Journal of Biotechnology 145, 273–280. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.006

Dumax-Vorzet, A., Roboti, P., High, S., 2013. OST4 is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase required for efficient N-glycosylation. J Cell Sci 126, 2595–2606. https://doi.org/10.1242/jcs.115410

Eichler-Stahlberg, A., Weisheit, W., Ruecker, O., Heitzer, M., 2009. Strategies to facilitate transgene expression in Chlamydomonas reinhardtii. Planta 229, 873–883. https://doi.org/10.1007/s00425-008-0879-x

Elalla, M.A., Shalaby, A., 2009. 0Antioxidant activity of extract and semi- purified fractions of marine red macroalga, Gra 7.

Ellerin, T., Rubin, R.H., Weinblatt, M.E., 2003. Infections and anti–tumor necrosis factor α therapy. Arthritis & Rheumatism 48, 3013–3022. https://doi.org/10.1002/art.11301

Elvin, J.G., Couston, R.G., van der Walle, C.F., 2013. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. Int J Pharm 440, 83–98. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.039

Esko, J.D., Stanley, P., 2009. Glycosylation Mutants of Cultured Cells. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Faye, L., Gomord, V., Fitchettelaine, A.C., Chrispeels, M.J., 1993. Affinity Purification of Antibodies Specific for Asn-Linked Glycans Containing α1 → 3 Fucose or β1 → 2 Xylose. Analytical Biochemistry 209, 104–108. https://doi.org/10.1006/abio.1993.1088

Frank, C.G., Aebi, M., 2005. ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. Glycobiology 15, 1156–1163. https://doi.org/10.1093/glycob/cwj002

Galili, U., Shohet, S.B., Kobrin, E., Stults, C.L., Macher, B.A., 1988. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. J. Biol. Chem. 263, 17755–17762.

Galli, C., Bernasconi, R., Soldà, T., Calanca, V., Molinari, M., 2011. Malectin Participates in a Backup Glycoprotein Quality Control Pathway in the Mammalian ER. PLOS ONE 6, e16304. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016304

Gao, X.-D., Tachikawa, H., Sato, T., Jigami, Y., Dean, N., 2005. Alg14 Recruits Alg13 to the Cytoplasmic Face of the Endoplasmic Reticulum to Form a Novel Bipartite UDP-N-acetylglucosamine Transferase Required for the Second Step of N-Linked Glycosylation. J. Biol. Chem. 280, 36254–36262. https://doi.org/10.1074/jbc.M507569200

Garénaux, E., Shams-Eldin, H., Chirat, F., Bieker, U., Schmidt, J., Michalski, J.-C., Cacan, R., Guérardel, Y., Schwarz, R.T., 2008. The Dual Origin of Toxoplasma gondii N-Glycans. Biochemistry 47, 12270–12276. https://doi.org/10.1021/bi801090a

Geshi, N., Johansen, J.N., Dilokpimol, A., Rolland, A., Belcram, K., Verger, S., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Kaneko, S., Tryfona, T., Dupree, P., Scheller, H.V., Höfte, H., Mouille, G., 2013. A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in Arabidopsis. Plant J 76, 128–137. https://doi.org/10.1111/tpj.12281

Ghaderi, D., Taylor, R.E., Padler-Karavani, V., Diaz, S., Varki, A., 2010. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. Nature Biotechnology 28, 863–867. https://doi.org/10.1038/nbt.1651

Gomord, V., Chamberlain, P., Jefferis, R., Faye, L., 2005. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. Trends in Biotechnology 23, 559–565. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.09.003

Gomord, V., Denmat, L.-A., Fitchette-Lainé, A.-C., Satiat-Jeunemaitre, B., Hawes, C., Faye, L., 1997. The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. The Plant Journal 11, 313–325. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11020313.x

Gomord, V., Fitchette, A.-C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., Faye, L., 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. Plant Biotechnology Journal 8, 564–587. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x

Goodenough, U., Lin, H., Lee, J.-H., 2007. Sex determination in Chlamydomonas. Seminars in Cell & Developmental Biology, Signal Transduction in the Myometrium 18, 350–361. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.02.006

Grabowski, G.A., 1995. Enzyme Therapy in Type 1 Gaucher Disease: Comparative Efficacy of Mannose-Terminated Glucocerebrosidase from Natural and Recombinant Sources. Annals of Internal Medicine 122, 33. https://doi.org/10.7326/0003-4819-122-1-199501010-00005

Grilo, A.L., Mantalaris, A., 2019. The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. Trends in Biotechnology 37, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014

Hagen, K.G.T., Fritz, T.A., Tabak, L.A., 2003. All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. Glycobiology 13, 1R-16R. https://doi.org/10.1093/glycob/cwg007

Hamilton, S.R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R.C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J.H., Rausch, S., Stadheim, T.A., Wischnewski, H., Wildt, S., Gerngross, T.U., 2003. Production of Complex Human Glycoproteins in Yeast. Science 301, 1244–1246. https://doi.org/10.1126/science.1088166

Hamilton, S.R., Davidson, R.C., Sethuraman, N., Nett, J.H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T.A., Li, H., Choi, B.-K., Hopkins, D., Wischnewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R.R., Hoopes, J., Wildt, S., Gerngross, T.U., 2006. Humanization of Yeast to Produce Complex

Terminally Sialylated Glycoproteins. Science 313, 1441–1443. https://doi.org/10.1126/science.1130256
Haserick, J.R., Leon, D.R., Samuelson, J., Costello, C.E., 2017. Asparagine-Linked Glycans of Cryptosporidium parvum Contain a Single Long Arm, Are Barely Processed in the Endoplasmic Reticulum (ER) or Golgi, and Show a Strong Bias for Sites with Threonine. Molecular & Cellular Proteomics 16, S42–S53. https://doi.org/10.1074/mcp.M116.066035
He, D.-M., Qian, K.-X., Shen, G.-F., Zhang, Z.-F., Li, Y.-N., Su, Z.-L., Shao, H.-B., 2007. Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in Chlamydomonas reinhardtii chroloplasts. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 55, 26–30. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.10.042
He, X., Galpin, J.D., Tropak, M.B., Mahuran, D., Haselhorst, T., Itzstein, M. von, Kolarich, D., Packer, N.H., Miao, Y., Jiang, L., Grabowski, G.A., Clarke, L.A., Kermode, A.R., 2012. Production of active human glucocerebrosidase in seeds of Arabidopsis thaliana complex-glycan-deficient (cgl) plants. Glycobiology 22, 492–503. https://doi.org/10.1093/glycob/cwr157
Heath, C., Kiss, R., 2007. Cell Culture Process Development: Advances in Process Engineering. Biotechnology Progress 23, 46–51. https://doi.org/10.1021/bp060344e
Heesen, S. te, Lehle, L., Weissmann, A., Aebi, M., 1994. Isolation of the ALG5 Locus Encoding the UDP-Glucose:Dolichyl-Phosphate Glucosyltransferase from Saccharomyces cerevisiae. European Journal of Biochemistry 224, 71–79. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19996.x
Heitzer, M., Zschoernig, B., 2007. Construction of modular tandem expression vectors for the green alga Chlamydomonas reinhardtii using the Cre/lox-system. BioTechniques 43, 324–332. https://doi.org/10.2144/000112556
Helenius, J., Ng, D.T.W., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A., Aebi, M., 2002. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. Nature 415, 447–450. https://doi.org/10.1038/415447a
Hempel, F., Lau, J., Klingl, A., Maier, U.G., 2011. Algae as Protein Factories: Expression of a Human Antibody and the Respective Antigen in the Diatom Phaeodactylum tricornutum. PLOS ONE 6, e28424. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028424
Hempel, F., Maier, U.G., 2012. An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency. Microbial Cell Factories 11, 126. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-126
Hempel, F., Maurer, M., Brockmann, B., Mayer, C., Biedenkopf, N., Kelterbaum, A., Becker, S., Maier, U.G., 2017. From hybridomas to a robust microalgal-based production platform: molecular design of a diatom secreting monoclonal antibodies directed against the Marburg virus nucleoprotein. Microbial Cell Factories 16, 131. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0745-2
Henderson, B., 1995. Therapeutic modulation of cytokines. Ann Rheum Dis 54, 519–523.
Ho, R.J.Y., Gibaldi, M., 2013. Biotechnology and Biopharmaceuticals, in: Biotechnology and Biopharmaceuticals. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, pp. 307–356. https://doi.org/10.1002/9781118660485.ch12
Hokke, C.H., Bergwerff, A.A., van Dedem, G.W.K., van Oostrum, J., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G., 1990. Sialylated carbohydrate chains of recombinant human glycoproteins expressed in Chinese hamster ovary cells contain traces of N-glycolylneuraminic acid. FEBS Letters 275, 9–14. https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81427-P
Hossler, P., Khattak, S.F., Li, Z.J., 2009. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. Glycobiology 19, 936–949. https://doi.org/10.1093/glycob/cwp079
Hou, J., Tyo, K.E.J., Liu, Z., Petranovic, D., Nielsen, J., 2012. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Research 12, 491–510. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00810.x
Hyams, J., Davies, D.R., 1972. The induction and characterisation of cell wall mutants of Chlamydomonas reinhardi. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 14, 381–389. https://doi.org/10.1016/0027-5107(72)90135-2

Jansen, G., Määttänen, P., Denisov, A.Y., Scarffe, L., Schade, B., Balghi, H., Dejgaard, K., Chen, L.Y., Muller, W.J., Gehring, K., Thomas, D.Y., 2012. An Interaction Map of Endoplasmic Reticulum Chaperones and Foldases. Molecular & Cellular Proteomics 11, 710–723. https://doi.org/10.1074/mcp.M111.016550

Jansing, J., Sack, M., Augustine, S.M., Fischer, R., Bortesi, L., 2018. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in Nicotiana benthamiana for the production of recombinant proteins lacking β-1,2-xylose and core α-1,3-fucose. Plant Biotechnology Journal 0. https://doi.org/10.1111/pbi.12981

Johnson, I.S., 1983. Human insulin from recombinant DNA technology. Science 219, 632–637. https://doi.org/10.1126/science.6337396

Ju, T., Brewer, K., D'Souza, A., Cummings, R.D., Canfield, W.M., 2002. Cloning and Expression of Human Core 1 β1,3-Galactosyltransferase. J. Biol. Chem. 277, 178–186. https://doi.org/10.1074/jbc.M109060200

Kallolimath, S., Castilho, A., Strasser, R., Grünwald-Gruber, C., Altmann, F., Strubl, S., Galuska, C.E., Zlatina, K., Galuska, S.P., Werner, S., Thiesler, H., Werneburg, S., Hildebrandt, H., Gerardy-Schahn, R., Steinkellner, H., 2016. Engineering of complex protein sialylation in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 113, 9498–9503. https://doi.org/10.1073/pnas.1604371113

Kamiya, Y., Kamiya, D., Yamamoto, K., Nyfeler, B., Hauri, H.-P., Kato, K., 2008. Molecular Basis of Sugar Recognition by the Human L-type Lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36. J. Biol. Chem. 283, 1857–1861. https://doi.org/10.1074/jbc.M709384200

Karaoglu, D., Kelleher, D.J., Gilmore, R., 2001. Allosteric Regulation Provides a Molecular Mechanism for Preferential Utilization of the Fully Assembled Dolichol-Linked Oligosaccharide by the Yeast Oligosaccharyltransferase. Biochemistry 40, 12193–12206. https://doi.org/10.1021/bi0111911

Karas, B.J., Diner, R.E., Lefebvre, S.C., McQuaid, J., Phillips, A.P.R., Noddings, C.M., Brunson, J.K., Valas, R.E., Deerinck, T.J., Jablanovic, J., Gillard, J.T.F., Beeri, K., Ellisman, M.H., Glass, J.I., Hutchison Iii, C.A., Smith, H.O., Venter, J.C., Allen, A.E., Dupont, C.L., Weyman, P.D., 2015. Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. Nature Communications 6, 6925. https://doi.org/10.1038/ncomms7925

Kaulfürst-Soboll, H., Rips, S., Koiwa, H., Kajiura, H., Fujiyama, K., Schaewen, A. von, 2011. Reduced Immunogenicity of Arabidopsis hgl1 Mutant N-Glycans Caused by Altered Accessibility of Xylose and core Fucose Epitopes. J. Biol. Chem. 286, 22955–22964. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.196097

Kean, E.L., Münster-Kühnel, A.K., Gerardy-Schahn, R., 2004. CMP-sialic acid synthetase of the nucleus. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Cytoplasmic glycosylation 1673, 56–65. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.04.006

Keeling, P.J., 2013. The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution. Annual Review of Plant Biology 64, 583–607. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120144

Kelleher, D.J., Gilmore, R., 2006. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. Glycobiology 16, 47R–62R. https://doi.org/10.1093/glycob/cwj066

Kelleher, D.J., Karaoglu, D., Mandon, E.C., Gilmore, R., 2003. Oligosaccharyltransferase Isoforms that Contain Different Catalytic STT3 Subunits Have Distinct Enzymatic Properties. Molecular Cell 12, 101–111. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00243-0

Kindle, K.L., 1990. High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii. Proceedings of the National Academy of Sciences 87, 1228–1232. https://doi.org/10.1073/pnas.87.3.1228

Kjeldsen, T., Ludvigsen, S., Diers, I., Balschmidt, P., Sørensen, A.R., Kaarsholm, N.C., 2002. Engineering-enhanced Protein Secretory Expression in Yeast with Application to Insulin. J. Biol. Chem. 277, 18245–18248. https://doi.org/10.1074/jbc.C200137200

Klutts, J.S., Levery, S.B., Doering, T.L., 2007. A β-1,2-Xylosyltransferase from Cryptococcus neoformans Defines a New Family of Glycosyltransferases. J. Biol. Chem. 282, 17890–17899. https://doi.org/10.1074/jbc.M701941200

Ko, K., Tekoah, Y., Rudd, P.M., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Spitsin, S., Hanlon, C.A., Rupprecht, C., Dietzschold, B., Golovkin, M., Koprowski, H., 2003. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. PNAS 100, 8013–8018. https://doi.org/10.1073/pnas.0832472100

Kowarik, M., Young, N.M., Numao, S., Schulz, B.L., Hug, I., Callewaert, N., Mills, D.C., Watson, D.C., Hernandez, M., Kelly, J.F., Wacker, M., Aebi, M., 2006. Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. The EMBO Journal 25, 1957–1966. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601087

Kranz, C., Jungeblut, C., Denecke, J., Erlekotte, A., Sohlbach, C., Debus, V., Kehl, H.G., Harms, E., Reith, A., Reichel, S., Gröbe, H., Hammersen, G., Schwarzer, U., Marquardt, T., 2007. A Defect in Dolichol Phosphate Biosynthesis Causes a New Inherited Disorder with Death in Early Infancy. The American Journal of Human Genetics 80, 433–440. https://doi.org/10.1086/512130

Krishna, R.G., Wold, F., 1993. Post-Translational Modifications of Proteins, in: Imahori, K., Sakiyama, F. (Eds.), Methods in Protein Sequence Analysis. Springer US, Boston, MA, pp. 167–172. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1603-7_21

Kruse, O., Hankamer, B., 2010. Microalgal hydrogen production. Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology – Environmental biotechnology 21, 238–243. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.012

Kurosaka, A., Yano, A., Itoh, N., Kuroda, Y., Nakagawa, T., Kawasaki, T., 1991. The structure of a neural specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by anti-horseradish peroxidase antiserum. J. Biol. Chem. 266, 4168–4172.

Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A.-C., Gomord, V., Faye, L., 1998. N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. Plant Mol Biol 38, 31–48. https://doi.org/10.1023/A:1006012005654

Levy-Ontman, O., Arad, S. (Malis), Harvey, D.J., Parsons, T.B., Fairbanks, A., Tekoah, Y., 2011. Unique N-Glycan Moieties of the 66-kDa Cell Wall Glycoprotein from the Red Microalga Porphyridium sp. Journal of Biological Chemistry 286, 21340–21352. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.175042

Levy-Ontman, O., Fisher, M., Shotland, Y., Weinstein, Y., Tekoah, Y., Arad, S.M., 2014. Genes Involved in the Endoplasmic Reticulum N-Glycosylation Pathway of the Red Microalga Porphyridium sp.: A Bioinformatic Study. International Journal of Molecular Sciences 15, 2305–2326. https://doi.org/10.3390/ijms15022305

Lewin, J.C., Lewin, R.A., Philpott, D.E., 1958. Observations on Phaeodactylum tricornutum. Microbiology 18, 418–426. https://doi.org/10.1099/00221287-18-2-418

Li, H., d'Anjou, M., 2009. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. Current Opinion in Biotechnology, Chemical biotechnology ● Pharmaceutical biotechnology 20, 678–684. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.009

Li, J., Stoddard, T.J., Demorest, Z.L., Lavoie, P.-O., Luo, S., Clasen, B.M., Cedrone, F., Ray, E.E., Coffman, A.P., Daulhac, A., Yabandith, A., Retterath, A.J., Mathis, L., Voytas, D.F., D'Aoust, M.-A., Zhang, F., 2016. Multiplexed, targeted gene editing in Nicotiana benthamiana for glyco-engineering and monoclonal antibody production. Plant Biotechnology Journal 14, 533–542. https://doi.org/10.1111/pbi.12403

Liebminger, E., Hüttner, S., Vavra, U., Fischl, R., Schoberer, J., Grass, J., Blaukopf, C., Seifert, G.J., Altmann, F., Mach, L., Strasser, R., 2009. Class I α-Mannosidases Are Required for N-Glycan Processing and Root Development in Arabidopsis thaliana. The Plant Cell 21, 3850–3867. https://doi.org/10.1105/tpc.109.072363

Liebminger, E., Veit, C., Pabst, M., Batoux, M., Zipfel, C., Altmann, F., Mach, L., Strasser, R., 2011. β-N-Acetylhexosaminidases HEXO1 and HEXO3 Are Responsible for the Formation of

Paucimannosidic N-Glycans in Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem. 286, 10793–10802. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178020
Lingg, N., Zhang, P., Song, Z., Bardor, M., 2012. The sweet tooth of biopharmaceuticals: Importance of recombinant protein glycosylation analysis. Biotechnology Journal 7, 1462–1472. https://doi.org/10.1002/biot.201200078
Macher, B.A., Galili, U., 2008. The Galα1,3Galβ1,4GlcNAc-R (α-Gal) epitope: A carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1780, 75–88. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.003
Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer, T.H., 1989. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. Anal. Biochem. 180, 195–204.
Malphettes, L., Freyvert, Y., Chang, J., Liu, P.-Q., Chan, E., Miller, J.C., Zhou, Z., Nguyen, T., Tsai, C., Snowden, A.W., Collingwood, T.N., Gregory, P.D., Cost, G.J., 2010. Highly efficient deletion of FUT8 in CHO cell lines using zinc-finger nucleases yields cells that produce completely nonfucosylated antibodies. Biotechnol. Bioeng. 106, 774–783. https://doi.org/10.1002/bit.22751
Manduzio, H., Fitchette, A.-C., Hrabina, M., Chabre, H., Batard, T., Nony, E., Faye, L., Moingeon, P., Gomord, V., 2012. Glycoproteins are species-specific markers and major IgE reactants in grass pollens. Plant Biotechnology Journal 10, 184–194. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00654.x
Marshall, W.F., 2008. Chapter 1 Basal Bodies: Platforms for Building Cilia, in: Current Topics in Developmental Biology, Ciliary Function in Mammalian Development. Academic Press, pp. 1–22. https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00801-6
Martino, A.D., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., Bowler, C., 2007. Genetic and phenotypic characterization of Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae) accessions1. Journal of Phycology 43, 992–1009. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x
Mathieu-Rivet, E., Kiefer-Meyer, M.-C., Vanier, G., Ovide, C., Burel, C., Lerouge, P., Bardor, M., 2014. Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals. Frontiers in Plant Science 5. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00359
Mathieu-Rivet, E., Lerouge, P., Bardor, M., 2017. Chlamydomonas reinhardtii: Protein Glycosylation and Production of Biopharmaceuticals, in: Hippler, M. (Ed.), Chlamydomonas: Biotechnology and Biomedicine, Microbiology Monographs. Springer International Publishing, Cham, pp. 45–72. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66360-9_3
Mathieu-Rivet, E., Scholz, M., Arias, C., Dardelle, F., Schulze, S., Mauff, F.L., Teo, G., Hochmal, A.K., Blanco-Rivero, A., Loutelier-Bourhis, C., Kiefer-Meyer, M.-C., Fufezan, C., Burel, C., Lerouge, P., Martinez, F., Bardor, M., Hippler, M., 2013. Exploring the N-glycosylation Pathway in Chlamydomonas reinhardtii Unravels Novel Complex Structures. Molecular & Cellular Proteomics 12, 3160–3183. https://doi.org/10.1074/mcp.M113.028191
Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M., Sasaki, R., 1995. Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. Plant Mol Biol 27, 1163–1172. https://doi.org/10.1007/BF00020889
Mayfield, S.P., Franklin, S.E., Lerner, R.A., 2003. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. PNAS 100, 438–442. https://doi.org/10.1073/pnas.0237108100
Meehl, M.A., Stadheim, T.A., 2014. Biopharmaceutical discovery and production in yeast. Current Opinion in Biotechnology, Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology 30, 120–127. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.007
Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.-H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.-L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-

Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.-P., Riaño-Pachón, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.-J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W.C.A., Otillar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., Grossman, A.R., 2007. The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. Science 318, 245–250. https://doi.org/10.1126/science.1143609

Mercx, S., Smargiasso, N., Chaumont, F., De Pauw, E., Boutry, M., Navarre, C., 2017. Inactivation of the β(1,2)-xylosyltransferase and the α(1,3)-fucosyltransferase genes in Nicotiana tabacum BY-2 Cells by a Multiplex CRISPR/Cas9 Strategy Results in Glycoproteins without Plant-Specific Glycans. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00403

Misaki, R., Fujiyama, K., Seki, T., 2006. Expression of human CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase and CMP-sialic acid transporter in tobacco suspension-cultured cell. Biochemical and Biophysical Research Communications 339, 1184–1189. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.130

Mócsai, R., Figl, R., Troschl, C., Strasser, R., Svehla, E., Windwarder, M., Thader, A., Altmann, F., 2019. N-glycans of the microalga Chlorella vulgaris are of the oligomannosidic type but highly methylated. Sci Rep 9. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36884-1

Munro, S., 2001. What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? FEBS Letters 498, 223–227. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02488-7

Nagasu, T., Shimma, Y.-I., Nakanishi, Y., Kuromitsu, J., Iwama, K., Nakayama, K.-I., Suzuki, K., Jigami, Y., 1992. Isolation of new temperature-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae deficient in mannose outer chain elongation. Yeast 8, 535–547. https://doi.org/10.1002/yea.320080705

Nakanishi-Shindo, Y., Nakayama, K., Tanaka, A., Toda, Y., Jigami, Y., 1993. Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6-polymannose outer chain from och1, och1 mnn1, and och1 mnn1 alg3 mutants of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 268, 26338–26345.

Nakayama, K., Feng, Y., Tanaka, A., Jigami, Y., 1998. The involvement of mnn4 and mnn6 mutations in mannosylphosphorylation of O-linked oligosaccharide in yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1425, 255–262. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00078-6

Navarro, F.J., Baulcombe, D.C., 2019. miRNA-Mediated Regulation of Synthetic Gene Circuits in the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii. ACS Synth. Biol. 8, 358–370. https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00393

Nguema-Ona, E., Vicré-Gibouin, M., Gotté, M., Plancot, B., Lerouge, P., Bardor, M., Driouich, A., 2014. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. Frontiers in Plant Science 5, 499. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00499

North, S.J., Huang, H.-H., Sundaram, S., Jang-Lee, J., Etienne, A.T., Trollope, A., Chalabi, S., Dell, A., Stanley, P., Haslam, S.M., 2010. Glycomics Profiling of Chinese Hamster Ovary Cell Glycosylation Mutants Reveals N-Glycans of a Novel Size and Complexity. Journal of Biological Chemistry 285, 5759–5775. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068353

Nymark, M., Sharma, A.K., Sparstad, T., Bones, A.M., Winge, P., 2016. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. Scientific Reports 6, 24951. https://doi.org/10.1038/srep24951

Odani, T., Shimma, Y., Wang, X.-H., Jigami, Y., 1997. Mannosylphosphate transfer to cell wall mannan is regulated by the transcriptional level of the MNN4 gene in Saccharomyces cerevisiae. FEBS Letters 420, 186–190. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01513-5

O'Neill, E., Kuhaudomlarp, S., Rejzek, M., Fangel, J., Alagesan, K., Kolarich, D., Willats, W., Field, R., O'Neill, E.C., Kuhaudomlarp, S., Rejzek, M., Fangel, J.U., Alagesan, K., Kolarich, D., Willats, W.G.T., Field, R.A., 2017. Exploring the Glycans of Euglena gracilis. Biology 6, 45. https://doi.org/10.3390/biology6040045

Pabst, M., Grass, J., Toegel, S., Liebminger, E., Strasser, R., Altmann, F., 2012. Isomeric analysis of oligomannosidic N-glycans and their dolichol-linked precursors. Glycobiology 22, 389–399. https://doi.org/10.1093/glycob/cwr138

Paccalet, T., Bardor, M., Rihouey, C., Delmas, F., Chevalier, C., D'Aoust, M.-A., Faye, L., Vézina, L., Gomord, V., Lerouge, P., 2007. Engineering of a sialic acid synthesis pathway in transgenic plants by expression of bacterial Neu5Ac-synthesizing enzymes. Plant Biotechnology Journal 5, 16–25. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00211.x

Padler-Karavani, V., Varki, A., 2011. Potential impact of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid on transplant rejection risk. Xenotransplantation 18, 1–5. https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2011.00622.x

Pagny, S., Bouissonnie, F., Sarkar, M., Follet-Gueye, M.L., Driouich, A., Schachter, H., Faye, L., Gomord, V., 2003. Structural requirements for Arabidopsisβ1,2-xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. The Plant Journal 33, 189–203. https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2002.01604.x

Palacpac, N.Q., Yoshida, S., Sakai, H., Kimura, Y., Fujiyama, K., Yoshida, T., Seki, T., 1999. Stable expression of human β1,4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. Proceedings of the National Academy of Sciences 96, 4692–4697. https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4692

Parekh, R.B., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Thomas, J.R., Rademacher, T.W., Warren, T., Wun, T.C., Hebert, B., Reitz, B., 1989. N-Glycosylation and in vitro enzymic activity of human recombinant tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells and a murine cell line. Biochemistry 28, 7670–7679. https://doi.org/10.1021/bi00445a023

Parkins, D.A., Lashmar, U.T., 2000. The formulation of biopharmaceutical products. Pharmaceutical Science & Technology Today 3, 129–137. https://doi.org/10.1016/S1461-5347(00)00248-0

Pastores, G.M., 2010. Recombinant Glucocerebrosidase (Imiglucerase) as a Therapy for Gaucher Disease. BioDrugs 24, 41–47. https://doi.org/10.2165/11318540-000000000-00000

Peter-Katalinić, J., 2005. Methods in Enzymology: O-Glycosylation of Proteins, in: Enzymology, B.-M. in (Ed.), Mass Spectrometry: Modified Proteins and Glycoconjugates. Academic Press, pp. 139–171.

Petrescu, A.-J., Milac, A.-L., Petrescu, S.M., Dwek, R.A., Wormald, M.R., 2004. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. Glycobiology 14, 103–114. https://doi.org/10.1093/glycob/cwh008

Petruccelli, S., Otegui, M.S., Lareu, F., Tran Dinh, O., Fitchette, A.-C., Circosta, A., Rumbo, M., Bardor, M., Carcamo, R., Gomord, V., Beachy, R.N., 2006. A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. Plant Biotechnology Journal 4, 511–527. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00200.x

Pourcq, K.D., Schutter, K.D., Callewaert, N., 2010. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 87, 1617–1631. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2721-1

Pretel, R., Lennon, K., Bird, A., Kukuruzinska, M.A., 1995. Expression of the First N-Glycosylation Gene in the Dolichol Pathway, ALG7, Is Regulated at Two Major Control Points in the G1 Phase of the Saccharomyces cerevisiae Cell Cycle. Experimental Cell Research 219, 477–486. https://doi.org/10.1006/excr.1995.1255

Qu, Y., Egelund, J., Gilson, P.R., Houghton, F., Gleeson, P.A., Schultz, C.J., Bacic, A., 2008. Identification of a novel group of putative Arabidopsis thaliana β-(1,3)-galactosyltransferases. Plant Mol Biol 68, 43–59. https://doi.org/10.1007/s11103-008-9351-3

Ramos-Martinez, E.M., Fimognari, L., Sakuragi, Y., 2017. High-yield secretion of recombinant proteins from the microalga Chlamydomonas reinhardtii. Plant Biotechnology Journal 15, 1214–1224. https://doi.org/10.1111/pbi.12710

Rasala, B.A., Mayfield, S.P., 2015. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. Photosynth Res 123, 227–239. https://doi.org/10.1007/s11120-014-9994-7

Rasala, B.A., Muto, M., Lee, P.A., Jager, M., Cardoso, R.M.F., Behnke, C.A., Kirk, P., Hokanson, C.A., Crea, R., Mendez, M., Mayfield, S.P., 2010. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii. Plant Biotechnology Journal 8, 719–733. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00503.x

Raven, H., Raven, P., Chew, S., 2010. The Endocrine System - 2nd Edition [WWW Document]. URL https://www.elsevier.com/books/the-endocrine-system/9780702033728 (accessed 5.30.19).

Rayner, J.C., Munro, S., 1998. Identification of the MNN2 and MNN5Mannosyltransferases Required for Forming and Extending the Mannose Branches of the Outer Chain Mannans of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 273, 26836–26843. https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26836

Robbe, C., Capon, C., Coddeville, B., Michalski, J.-C., 2004. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. Biochemical Journal 384, 307–316. https://doi.org/10.1042/BJ20040605

Rochaix, J.-D., 2002. Chlamydomonas, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes. FEBS Letters 529, 34–38. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03181-2

Rouwendal, G.J.A., Wuhrer, M., Florack, D.E.A., Koeleman, C.A.M., Deelder, A.M., Bakker, H., Stoopen, G.M., van Die, I., Helsper, J.P.F.G., Hokke, C.H., Bosch, D., 2007. Efficient introduction of a bisecting GlcNAc residue in tobacco N-glycans by expression of the gene encoding human N-acetylglucosaminyltransferase III. Glycobiology 17, 334–344. https://doi.org/10.1093/glycob/cwl078

Ruiz-Canada, C., Kelleher, D.J., Gilmore, R., 2009. Cotranslational and Posttranslational N-Glycosylation of Polypeptides by Distinct Mammalian OST Isoforms. Cell 136, 272–283. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.047

Saito, F., Suyama, A., Oka, T., Yoko-O, T., Matsuoka, K., Jigami, Y., Shimma, Y.-I., 2014. Identification of Novel Peptidyl Serine α-Galactosyltransferase Gene Family in Plants. J. Biol. Chem. 289, 20405–20420. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.553933

Samuelson, J., Banerjee, S., Magnelli, P., Cui, J., Kelleher, D.J., Gilmore, R., Robbins, P.W., 2005. The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. PNAS 102, 1548–1553. https://doi.org/10.1073/pnas.0409460102

Samuelson, J., Robbins, P.W., 2015. Effects of N-glycan precursor length diversity on quality control of protein folding and on protein glycosylation. Seminars in Cell & Developmental Biology, Dendritic cell development and function & Protein quality control through glycosylation 41, 121–128. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.11.008

Sandrin, M.S., Osman, N., Mckenzie, I.F.C., 1997. Transgenic approaches for the reduction in expression of GALα (1, 3) GAL for xenotransplantationTable of Contents. Frontiers in Bioscience.

Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A., Fukuda, M., 1987. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. J. Biol. Chem. 262, 12059–12076.

Sato, C., Kim, J.-H., Abe, Y., Saito, K., Yokoyama, S., Kohda, D., 2000. Characterization of the N-Oligosaccharides Attached to the Atypical Asn-X-Cys Sequence of Recombinant Human

Epidermal Growth Factor Receptor. J Biochem 127, 65–72. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022585

Scaife, M.A., Nguyen, G.T., Rico, J., Lambert, D., Helliwell, K.E., Smith, A.G., 2015. Establishing Chlamydomonas reinhardtii as an industrial biotechnology host. Plant J 82, 532–546. https://doi.org/10.1111/tpj.12781

Schähs, M., Strasser, R., Stadlmann, J., Kunert, R., Rademacher, T., Steinkellner, H., 2007. Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern. Plant Biotechnology Journal 5, 657–663. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00273.x

Schiller, B., Hykollari, A., Yan, S., Paschinger, K., Wilson, I.B.H., 2012. Complicated N-linked glycans in simple organisms. bchm 393, 661–673. https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0150

Schnell, R.A., Lefebvre, P.A., 1993. Isolation of the Chlamydomonas regulatory gene NIT2 by transposon tagging. Genetics 134, 737–747.

Schulze, S., Oltmanns, A., Machnik, N., Liu, G., Xu, N., Jarmatz, N., Scholz, M., Sugimoto, K., Fufezan, C., Huang, K., Hippler, M., 2018. N-Glycoproteomic Characterization of Mannosidase and Xylosyltransferase Mutant Strains of Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiology 176, 1952–1964. https://doi.org/10.1104/pp.17.01450

Schulze, S., Urzica, E., Reijnders, M.J.M.F., van de Geest, H., Warris, S., Bakker, L.V., Fufezan, C., Martins dos Santos, V.A.P., Schaap, P.J., Peters, S.A., Hippler, M., 2017. Identification of methylated GnTI-dependent N-glycans in Botryococcus brauni. New Phytologist 215, 1361–1369. https://doi.org/10.1111/nph.14713

Schuster, M., Jost, W., Mudde, G.C., Wiederkum, S., Schwager, C., Janzek, E., Altmann, F., Stadlmann, J., Stemmer, C., Gorr, G., 2007. In vivo glyco-engineered antibody with improved lytic potential produced by an innovative non-mammalian expression system. Biotechnology Journal 2, 700–708. https://doi.org/10.1002/biot.200600255

Serif, M., Lepetit, B., Weißert, K., Kroth, P.G., Rio Bartulos, C., 2017. A fast and reliable strategy to generate TALEN-mediated gene knockouts in the diatom Phaeodactylum tricornutum. Algal Research 23, 186–195. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.005

Sethuraman, N., Stadheim, T.A., 2006. Challenges in therapeutic glycoprotein production. Current Opinion in Biotechnology, Protein technologies 17, 341–346. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.010

Séveno, M., Bardor, M., Paccalet, T., Gomord, V., Lerouge, P., Faye, L., 2004. Glycoprotein sialylation in plants? Nature Biotechnology 22, 1351. https://doi.org/10.1038/nbt1104-1351

Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G., Dym, O., Boldin-Adamsky, S.A., Silman, I., Sussman, J.L., Futerman, A.H., Aviezer, D., 2007. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. Plant Biotechnology Journal 5, 579–590. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x

Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda, H., 1998. High-Efficiency Transformation of Chlamydomonas reinhardtii by Electroporation. Genetics 148, 1821–1828.

Shin, Y.S., Jeong, J., Nguyen, T.H.T., Kim, J.Y.H., Jin, E., Sim, S.J., 2019. Targeted knockout of phospholipase A2 to increase lipid productivity in Chlamydomonas reinhardtii for biodiesel production. Bioresource Technology 271, 368–374. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.121

Sommer, T.R., D'Souza, F.M.L., Morrissy, N.M., 1992. Pigmentation of adult rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, using the green alga Haematococcus pluvialis. Aquaculture 106, 63–74. https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90250-O

Sourrouille, C., Marquet-Blouin, E., D'Aoust, M.-A., Kiefer-Meyer, M.-C., Seveno, M., Pagny-Salehabadi, S., Bardor, M., Durambur, G., Lerouge, P., Vezina, L., Gomord, V., 2008. Down-regulated expression of plant-specific glycoepitopes in alfalfa. Plant Biotechnology Journal 6, 702–721. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00353.x

Sousa, M.C., Ferrero-Garcia, M.A., Parodi, A.J., 1992. Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. Biochemistry 31, 97–105. https://doi.org/10.1021/bi00116a015

Sriraman, R., Bardor, M., Sack, M., Vaquero, C., Faye, L., Fischer, R., Finnern, R., Lerouge, P., 2004. Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core-xylose and core-α(1,3)-fucose residues. Plant Biotechnology Journal 2, 279–287. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00078.x

Stanley, P., Taniguchi, N., Aebi, M., 2015. N-Glycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Stolz, J., Munro, S., 2002. The Components of the Saccharomyces cerevisiaeMannosyltransferase Complex M-Pol I Have Distinct Functions in Mannan Synthesis. J. Biol. Chem. 277, 44801–44808. https://doi.org/10.1074/jbc.M208023200

Strasser, R., 2016. Plant protein glycosylation. Glycobiology cww023. https://doi.org/10.1093/glycob/cww023

Strasser, R., Altmann, F., Mach, L., Glössl, J., Steinkellner, H., 2004. Generation of Arabidopsis thaliana plants with complex N-glycans lacking β1,2-linked xylose and core α1,3-linked fucose. FEBS Letters 561, 132–136. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00150-4

Strasser, R., Bondili, J.S., Schoberer, J., Svoboda, B., Liebminger, E., Glössl, J., Altmann, F., Steinkellner, H., Mach, L., 2007a. Enzymatic Properties and Subcellular Localization of Arabidopsis β-N-Acetylhexosaminidases. Plant Physiology 145, 5–16. https://doi.org/10.1104/pp.107.101162

Strasser, R., Bondili, J.S., Vavra, U., Schoberer, J., Svoboda, B., Glössl, J., Léonard, R., Stadlmann, J., Altmann, F., Steinkellner, H., Mach, L., 2007b. A Unique β1,3-Galactosyltransferase Is Indispensable for the Biosynthesis of N-Glycans Containing Lewis a Structures in Arabidopsis thaliana. The Plant Cell 19, 2278–2292. https://doi.org/10.1105/tpc.107.052985

Strasser, R., Castilho, A., Stadlmann, J., Kunert, R., Quendler, H., Gattinger, P., Jez, J., Rademacher, T., Altmann, F., Mach, L., Steinkellner, H., 2009. Improved Virus Neutralization by Plant-produced Anti-HIV Antibodies with a Homogeneous β1,4-Galactosylated N-Glycan Profile. J. Biol. Chem. 284, 20479–20485. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014126

Strasser, R., Mucha, J., Mach, L., Altmann, F., Wilson, I.B.H., Glössl, J., Steinkellner, H., 2000. Molecular cloning and functional expression of β1,2-xylosyltransferase cDNA from Arabidopsis thaliana 1. FEBS Letters 472, 105–108. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01443-5

Strasser, R., Mucha, J., Schwihla, H., Altmann, F., Glössl, J., Steinkellner, H., 1999. Molecular cloning and characterization of cDNA coding for β1,2N-acetylglucosaminyltransferase I (GlcNAc-TI) from Nicotiana tabacum. Glycobiology 9, 779–785. https://doi.org/10.1093/glycob/9.8.779

Strasser, R., Stadlmann, J., Schähs, M., Stiegler, G., Quendler, H., Mach, L., Glössl, J., Weterings, K., Pabst, M., Steinkellner, H., 2008. Generation of glyco-engineered Nicotiana benthamiana for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. Plant Biotechnology Journal 6, 392–402. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00330.x

Stukenberg, D., Zauner, S., Dell'Aquila, G., Maier, U.G., 2018. Optimizing CRISPR/Cas9 for the Diatom Phaeodactylum tricornutum. Front Plant Sci 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00740

Sturla, L., Fruscione, F., Noda, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Contini, P., Tonetti, M., 2005. Core fucosylation of N-linked glycans in leukocyte adhesion deficiency/congenital disorder of glycosylation IIc fibroblasts. Glycobiology 15, 924–934. https://doi.org/10.1093/glycob/cwi081

Su, Z.-L., Qian, K.-X., Tan, C.-P., Meng, C.-X., Qin, S., 2005. Recombination and Heterologous Expression of Allophycocyanin Gene in the Chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 37, 709–712. https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00092.x

Sun, M., Qian, K., Su, N., Chang, H., Liu, J., Shen, G., 2003. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in Chlamydomonas reinhardtii chloroplast. Biotechnology Letters 25, 1087–1092. https://doi.org/10.1023/A:1024140114505

Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K., Dibal, F., Wagner, R., Rochaix, J.-D., Ajam, T., Surzycki, S., 2009. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. Biologicals, New Cell for New Vaccines III 37, 133–138. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.005

Takache, H., Pruvost, J., Cornet, J.-F., 2012. Kinetic modeling of the photosynthetic growth of Chlamydomonas reinhardtii in a photobioreactor. Biotechnology Progress 28, 681–692. https://doi.org/10.1002/btpr.1545

Takeuchi, H., Yu, H., Hao, H., Takeuchi, M., Ito, A., Li, H., Haltiwanger, R.S., 2017. O-Glycosylation modulates the stability of epidermal growth factor-like repeats and thereby regulates Notch trafficking. J. Biol. Chem. 292, 15964–15973. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.800102

Tandan, R., Hehir, M.K., Waheed, W., Howard, D.B., 2017. Rituximab treatment of myasthenia gravis: A systematic review. Muscle Nerve 56, 185–196. https://doi.org/10.1002/mus.25597

Tannous, A., Pisoni, G.B., Hebert, D.N., Molinari, M., 2015. N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER. Seminars in Cell & Developmental Biology, Dendritic cell development and function & Protein quality control through glycosylation 41, 79–89. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.12.001

Tearle, R.G., Tange, M.J., Zannettino, Z.L., Katerelos, M., Shinkel, T.A., Van Denderen, B.J.W., Lonie, A.J., Lyons, I., Nottle, M.B., Cox, T., Becker, C., Peura, A.M., Wigley, P.L., Crawford, R.J., Robins, A.J., Pearse, M.J., d'Apice, A.J.F., 1996. THE α-1,3-GALACTOSYLTRANSFERASE KNOCKOUT MOUSE: Implications for Xenotransplantation1. Transplantation 61, 13.

Tobisawa, Y., Imai, Y., Fukuda, M., Kawashima, H., 2010. Sulfation of Colonic Mucins by N-Acetylglucosamine 6-O-Sulfotransferase-2 and Its Protective Function in Experimental Colitis in Mice. J. Biol. Chem. 285, 6750–6760. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067082

Tran, M., Zhou, B., Pettersson, P.L., Gonzalez, M.J., Mayfield, S.P., 2009. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. Biotechnol. Bioeng. 104, 663–673. https://doi.org/10.1002/bit.22446

Twyman, R.M., Schillberg, S., Fischer, R., 2005. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. Expert Opinion on Emerging Drugs 10, 185–218. https://doi.org/10.1517/14728214.10.1.185

van Beers, M.M.C., Bardor, M., 2012. Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. Biotechnology Journal 7, 1473–1484. https://doi.org/10.1002/biot.201200065

van Tol, W., Wessels, H., Lefeber, D.J., 2019. O-glycosylation disorders pave the road for understanding the complex human O-glycosylation machinery. Current Opinion in Structural Biology, SI: 56 Sequences and topology (2019) 56, 107–118. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.006

Vanier, G., Hempel, F., Chan, P., Rodamer, M., Vaudry, D., Maier, U.G., Lerouge, P., Bardor, M., 2015. Biochemical Characterization of Human Anti-Hepatitis B Monoclonal Antibody Produced in the Microalgae Phaeodactylum tricornutum. PLOS ONE 10, e0139282. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139282

Vanier, G., Lucas, P.-L., Loutelier-Bourhis, C., Vanier, J., Plasson, C., Walet-Balieu, M.-L., Tchi-Song, P.C., Remy-Jouet, I., Richard, V., Bernard, S., Driouich, A., Afonso, C., Lerouge, P., Mathieu-Rivet, E., Bardor, M., 2017. Heterologous expression of the N -acetylglucosaminyltransferase I dictates a reinvestigation of the N -glycosylation pathway in Chlamydomonas reinhardtii. Scientific Reports 7, 10156. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10698-z

Vanier, G., Stelter, S., Vanier, J., Hempel, F., Maier, U.G., Lerouge, P., Ma, J., Bardor, M., 2018. Alga-Made Anti-Hepatitis B Antibody Binds to Human Fcγ Receptors. Biotechnology Journal 13, 1700496. https://doi.org/10.1002/biot.201700496

Varki, A., 2017. Biological roles of glycans. Glycobiology 27, 3–49. https://doi.org/10.1093/glycob/cww086

Velasquez, M., Salter, J.S., Dorosz, J.G., Petersen, B.L., Estevez, J.M., 2012. Recent Advances on the Posttranslational Modifications of EXTs and Their Roles in Plant Cell Walls. Front Plant Sci 3. https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00093

Velasquez, S.M., Ricardi, M.M., Dorosz, J.G., Fernandez, P.V., Nadra, A.D., Pol-Fachin, L., Egelund, J., Gille, S., Harholt, J., Ciancia, M., Verli, H., Pauly, M., Bacic, A., Olsen, C.E., Ulvskov, P., Petersen,

B.L., Somerville, C., Iusem, N.D., Estevez, J.M., 2011. O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. Science 332, 1401–1403. https://doi.org/10.1126/science.1206657

Vervecken, W., Kaigorodov, V., Callewaert, N., Geysens, S., Vusser, K.D., Contreras, R., 2004. In Vivo Synthesis of Mammalian-Like, Hybrid-Type N-Glycans in Pichia pastoris. Appl. Environ. Microbiol. 70, 2639–2646. https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2639-2646.2004

Vézina, L.-P., Faye, L., Lerouge, P., D'Aoust, M.-A., Marquet-Blouin, E., Burel, C., Lavoie, P.-O., Bardor, M., Gomord, V., 2009. Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. Plant Biotechnology Journal 7, 442–455. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00414.x

Vinaik, R., Kozlov, G., Gehring, K., 2013. Structure of the Non-Catalytic Domain of the Protein Disulfide Isomerase-Related Protein (PDIR) Reveals Function in Protein Binding. PLoS One 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062021

Voigt, J., Hinkelmann, B., Harris, E.H., 1997. Production of cell wall polypeptides by different cell wall mutants of the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii. Microbiological Research 152, 189–198. https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80012-2

Walsh, G., 2018. Biopharmaceutical benchmarks 2018. Nature Biotechnology 36, 1136–1145. https://doi.org/10.1038/nbt.4305

Walsh, G., 2014. Biopharmaceutical benchmarks 2014. Nat Biotech 32, 992–1000. https://doi.org/10.1038/nbt.3040

Walsh, G., 2002. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. European Journal of Pharmaceutical Sciences 15, 135–138. https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00222-6

Wang, Q., Stuczynski, M., Gao, Y., Betenbaugh, M.J., 2015. Strategies for Engineering Protein N-Glycosylation Pathways in Mammalian Cells, in: Castilho, A. (Ed.), Glyco-Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer New York, New York, NY, pp. 287–305. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2760-9_20

Wang, X., Brandsma, M., Tremblay, R., Maxwell, D., Jevnikar, A.M., Huner, N., Ma, S., 2008. A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). BMC Biotechnology 8, 87. https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-87

Ward, B.J., Landry, N., Trépanier, S., Mercier, G., Dargis, M., Couture, M., D'Aoust, M.-A., Vézina, L.-P., 2014. Human antibody response to N-glycans present on plant-made influenza virus-like particle (VLP) vaccines. Vaccine 32, 6098–6106. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.079

Williams, D.C., Frank, R.V., Muth, W.L., Burnett, J.P., 1982. Cytoplasmic inclusion bodies in Escherichia coli producing biosynthetic human insulin proteins. Science 215, 687–689. https://doi.org/10.1126/science.7036343

Wong, C.-H., 2005. Protein Glycosylation: New Challenges and Opportunities. J. Org. Chem. 70, 4219–4225. https://doi.org/10.1021/jo050278f

Wu, Y., Williams, M., Bernard, S., Driouich, A., Showalter, A.M., Faik, A., 2010. Functional identification of two nonredundant Arabidopsis alpha(1,2)fucosyltransferases specific to arabinogalactan proteins. J. Biol. Chem. 285, 13638–13645. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102715

Wurm, F.M., 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnology 22, 1393–1398. https://doi.org/10.1038/nbt1026

Xia, B., Royall, J.A., Damera, G., Sachdev, G.P., Cummings, R.D., 2005. Altered O-glycosylation and sulfation of airway mucins associated with cystic fibrosis. Glycobiology 15, 747–775. https://doi.org/10.1093/glycob/cwi061

Xing, Z., Kenty, B.M., Li, Z.J., Lee, S.S., 2009. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. Biotechnology and Bioengineering 103, 733–746. https://doi.org/10.1002/bit.22287

Yamane-Ohnuki, N., Kinoshita, S., Inoue-Urakubo, M., Kusunoki, M., Iida, S., Nakano, R., Wakitani, M., Niwa, R., Sakurada, M., Uchida, K., Shitara, K., Satoh, M., 2004. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. Biotechnol. Bioeng. 87, 614–622. https://doi.org/10.1002/bit.20151

Yang, Z., Li, yinü, Chen, F., Li, D., Zhang, Z., Liu, Y., Zheng, D., Wang, Y., Shen, G., 2006. Expression of human soluble TRAIL in Chlamydomonas reinhardtii chloroplast. CHINESE SCI BULL 51, 1703–1709. https://doi.org/10.1007/s11434-006-2041-0

Yao, J., Weng, Y., Dickey, A., Wang, K.Y., 2015. Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. International Journal of Molecular Sciences 16, 28549–28565. https://doi.org/10.3390/ijms161226122

Zeleny, R., Kolarich, D., Strasser, R., Altmann, F., 2006. Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadvertent contamination. Planta 224, 222–227. https://doi.org/10.1007/s00425-005-0206-8

Zhang, C., Hu, H., 2014. High-efficiency nuclear transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum by electroporation. Marine Genomics, Marine Diatoms 16, 63–66. https://doi.org/10.1016/j.margen.2013.10.003

Zhang, P., Burel, C., Plasson, C., Kiefer-Meyer, M.-C., Ovide, C., Gugi, B., Wan, C., Teo, G., Mak, A., Song, Z., Driouich, A., Lerouge, P., Bardor, M., 2019. Characterization of a GDP-Fucose transporter and a fucosyltransferase involved in the fucosylation of glycoproteins in the diatom Phaeodactylum tricornutum. Front. Plant Sci. 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00610

Zhang, R., Patena, W., Armbruster, U., Gang, S.S., Blum, S.R., Jonikas, M.C., 2014. High-Throughput Genotyping of Green Algal Mutants Reveals Random Distribution of Mutagenic Insertion Sites and Endonucleolytic Cleavage of Transforming DNA. The Plant Cell Online 26, 1398–1409. https://doi.org/10.1105/tpc.114.124099

Zhang, X., Lok, S.H.L., Kon, O.L., 1998. Stable expression of human α-2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1425, 441–452. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00095-6

Zhang, Y.-K., Shen, G.-F., Ru, B.-G., 2006. Survival of Human Metallothionein-2 Transplastomic Chlamydomonas reinhardtii to Ultraviolet B Exposure. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 38, 187–193. https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00148.x

Zhou, Q., Avila, L.Z., Konowicz, P.A., Harrahy, J., Finn, P., Kim, J., Reardon, M.R., Kyazike, J., Brunyak, E., Zheng, X., Patten, S.M.V., Miller, R.J., Pan, C.Q., 2013. Glycan Structure Determinants for Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor Binding and Cellular Uptake of a Recombinant Protein. Bioconjugate Chem. 24, 2025–2035. https://doi.org/10.1021/bc400365a

Zhou, Q., Shankara, S., Roy, A., Qiu, H., Estes, S., McVie-Wylie, A., Culm-Merdek, K., Park, A., Pan, C., Edmunds, T., 2008. Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function. Biotechnol. Bioeng. 99, 652–665. https://doi.org/10.1002/bit.21598

Zhu, A., Hurst, R., 2002. Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. Xenotransplantation 9, 376–381. https://doi.org/10.1034/j.1399-3089.2002.02138.x

Zimran, A., Brill-Almon, E., Chertkoff, R., Petakov, M., Blanco-Favela, F., Muñoz, E.T., Solorio-Meza, S.E., Amato, D., Duran, G., Giona, F., Heitner, R., Rosenbaum, H., Giraldo, P., Mehta, A., Park, G., Phillips, M., Elstein, D., Altarescu, G., Szleifer, M., Hashmueli, S., Aviezer, D., 2011. Pivotal trial with plant cell–expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease. Blood 118, 5767–5773. https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-366955

Zurzolo, C., Bowler, C., 2001. Exploring Bioinorganic Pattern Formation in Diatoms. A Story of Polarized Trafficking. Plant Physiology 127, 1339–1345. https://doi.org/10.1104/pp.010709

Annexes

Fungal Ecology 26 (2017) 109–113

Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funeco

Fungal tissue *per se* is stronger as a UV-B screen than secondary fungal extrolites in *Lobaria pulmonaria*

Yngvar Gauslaa [a, *], Md. Azharul Alam [a], Pierre-Louis Lucas [a], Dipa Paul Chowdhury [a], Knut Asbjørn Solhaug [a, b]

[a] Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management, Norwegian University of Life Sciences, PO Box 5003, NO-1432 Ås, Norway
[b] Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management, CERAD, Norwegian University of Life Sciences, P.O. Box 5003, NO-1432 Ås, Norway

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 August 2016
Received in revised form
21 December 2016
Accepted 11 January 2017

Corresponding Editor: Peter D. Crittenden

Keywords:
Carbon-based secondary compounds
Lobaria pulmonaria
Green algae
Stictic acid
Sun screens
UV-A
UV-B
UV tolerance
UV transmittance

ABSTRACT

To test the hypotheses that (1) protective mycobiont tissues and/or (2) medullary UV-B-absorbing carbon-based secondary compounds (CBSCs) protect lichen photobionts against UV-B radiation, we quantified cortical UV-transmittance and ran a three-way factorial lab experiment with (1) three UV radiation regimes, (2) photobiont layers with/without a screening cortex, and (3) with natural/reduced CBSC-concentration. We used melanin-deficient *Lobaria pulmonaria* from shaded forests. Maximum photochemical efficiency of photosystem II (*Fv*/*Fm*) in photobionts inside thalli with natural CBSC-concentrations was not affected by any UV-regime, consistent with close to 0% measured cortical transmittance of wavelengths <325 nm. Exposing photobiont layers to direct radiation strongly aggravated photoinhibition ($P < 0.001$), as did an increase in UV-exposure ($P < 0.001$). The effect of CBSC-removal was weaker (yet significant at $P = 0.001$), mainly affecting exposed photobiont layers given short-wavelength UV radiation. Based on these findings, we conclude that the primary role of extrolites in *L. pulmonaria* is not to screen excess solar radiation.

© 2017 Elsevier Ltd and British Mycological Society. All rights reserved.

1. Introduction

Most macrolichens are long-lived, self-supporting symbiotic associations of two mycobionts, an ascomycete and a cortex-inhabiting basidiomycete yeast (Spribille et al., 2016), and one or more photosynthetic partners (photobiont). The mycobionts provide shelter, water and mineral nutrients; the photobionts fix carbon, and nitrogen if cyanobacteria are involved. Such symbiotic associations are most dominant in solar-radiation exposed habitats at higher latitudes and elevations (Bjerke et al., 2002; Baniya et al., 2010), although some seek shelter in old forests (Rose, 1976) less exposed to high photosynthetic active radiation (PAR) and ultraviolet radiation (UV). The UV-tolerance of photobionts in shade-adapted lichens is not well known; most studies have been done with UV-B-resistant lichens of sun-exposed habitats (Sánchez et al., 2014; Brandt et al., 2015). Despite a high resistance to UV-B in lichen photobionts inside a thallus, a strong growth-depressing UV-B effect has recently been reported in lichen thalli, suggesting that the mycobiont may be the susceptible partner (Chowdhury et al., 2016). UV-B radiation can directly harm an organism by generating reactive oxygen species which may impair cellular processes (Buffoni-Hall et al., 2003; Pescheck et al., 2014).

Lichens often protect themselves from excess solar radiation by producing cortical compounds, such as parietin, usnic acid, atranorin and melanins, screening both UV and PAR (Solhaug and Gauslaa, 1996; Gauslaa and Solhaug, 2001; McEvoy et al., 2006; Solhaug and Gauslaa, 2012). These fungal pigments form a layer above the autotroph partner(s), and actually protect underlying susceptible photobiont cells from excess PAR (Solhaug et al., 2010). The concentration of cortical pigments varies seasonally with solar height (Gauslaa and McEvoy, 2005) and differs between lichen species (Bjerke et al., 2002) in ways consistent with a solar radiation-protective role. In general, carbon-based secondary compounds (CBSCs) with strong UV-B absorbance are also often assumed to protect against UV-B, whether they occur as cortical or

* Corresponding author.
E-mail address: yngvar.gauslaa@nmbu.no (Y. Gauslaa).

http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2017.01.005
1754-5048/© 2017 Elsevier Ltd and British Mycological Society. All rights reserved.

medullary compounds (e.g. Rikkinen, 1995). The intrathalline location of medullary CBSCs is less consistent with a UV-B-protective function. By contrast, there is strong evidence for a primary herbivore deterrent role of medullary CBSCs (Gauslaa, 2005; Pöykkö et al., 2005; Asplund et al., 2010; Asplund, 2011a; Cernajová and Svoboda, 2014). However, because medullary CBSCs also often extend upwards into the photobiont layer (Fahselt and Alstrup, 1997), a photoprotective role is possible.

We will expose (1) a photobiont layer protected by an intact upper cortex versus (2) a photobiont layer with protective fungal tissues removed in each of two categories: (a) thalli with natural and (b) reduced concentration of medullary CBSCs to various UV-treatments. Thereby, we intended to identify possible UV-protective fungal mechanisms on photobionts. Using cortical compound-deficient specimens of *Lobaria pulmonaria* with well-documented herbivore-deterrent functions of its medullary stictic acid complex (e.g. Asplund and Gauslaa, 2008), an additional solar radiation screening role of this CBSC complex would be consistent with the often assumed multiple function roles of such compounds. In short, our major objectives were: (1) to quantify the protection to photosystem II in lichen photobionts offered by the presence of the upper fungal cortex in a shade-adapted old forest lichen deficient in cortical CBSCs and melanin. (2) To quantify a UV-B-protective role of the herbivore-deterrent medullary stictic acid complex for the photobiont in *L. pulmonaria*. (3) To quantify transmittance through the upper lichen cortex for the entire UV-range (250–400 nm) by high-resolution equipment.

2. Material and methods

We collected pale, ash-grey and shade-adapted thalli of *L. pulmonaria* in September 2014 from trunks in old oak forests hosting large populations at Langangen, Porsgrunn, Telemark, Norway (59° 06′ 43″ N, 9° 50′ 05″ E, 140 m a.s.l.). Based on their color, we considered sampled thalli melanin-deficient. Attached moss and debris were removed before lichens were air dried and kept at −18 °C (1 month) until the experiment started. Sixty discs of 1 cm^2 were cut, one from central parts of each thallus. Thirty of the air-dry thalli were acetone-rinsed three times for 10 min to reduce their content of secondary compounds; the remaining 30 served as untreated controls. Acetone rinsing of dry thalli does not affect the viability of lichens (Solhaug and Gauslaa, 2001) and does not extract intracellular compounds (Pöykkö et al., 2005) because the acetone does not pass the cell membranes in desiccated tissues. Rapid CBSC re-synthesis after extraction (Solhaug and Gauslaa, 2004) shows that lichen viability is not compromised. Fifteen control discs and fifteen acetone-rinsed ones were placed upside down and gently rubbed with the tip of a glass Pasteur pipette under a dissecting microscope to remove the lower cortex and the photobiont-free part of the medulla. Failed efforts to remove the upper cortex in a similar manner showed that removing the lower fungal layers was the only way to prepare fully exposed and yet intact discs of a photobiont layer.

To prepare clean samples of the upper cortex, the photobiont layer was scraped from an additional disc whose lower cortex and medulla had been physically removed, and the cortical UV-transmittance spectrum (250–400 nm) was recorded by an Optronic OL-756 spectroradiometer (Optronic Laboratories, Orlando FL, USA) with an integrating sphere. A reference spectrum was first measured illuminating the port of the integrating sphere (OL IS-270, Optronic Laboratories) covered with cling film with UV-light through a 600 μm thick optical fiber from a DH-2000 (Ocean Optics, Dunedin, FL. USA) deuterium and halogen light source. The cortical transmission was measured by placing the cortex sample (ca. 3 mm × 3 mm) in close contact with the fiber upon the cling film.

All experimental *L. pulmonaria* discs, flattened under gentle pressure to facilitate treatments and reduce internal shading, were placed under three treatment conditions: (1) cling film transmitting radiation at all wavelengths (>275 nm) to simulate the full spectrum including UV-B, UV-A and PAR; (2) cellulose acetate foil (0.15 mm, Rachow Kunststoff Folien GmbH, Hamburg, Germany) transmitting radiation >295 nm; and (3) polycarbonate plates (clear polycarbonate, 1 mm, Finn Løken AS, Ås, Norway) transmitting radiation >390 nm. They received radiation from Philips TL20W/12RS UV-B lamps as the only light source, where PAR was just 3 μmol m^{-2} s^{-1} during the treatment. The radiation regime at the lichen level beneath the three respective screens is given in the insert of Fig. 1. The UV-B dose per day under UV-B tubes was 85 and 130 kJ m^{-2} d^{-1} for unscreened and cellulose-acetate screened treatments respectively. These doses are approximately five to ten times higher than the average daily UV-B dose in Norway during summer (Solhaug et al., 2003). We used 60 thalli in a factorial experiment with three treatments: (1) acetone-rinsed versus controls; (2) intact thalli versus exposed photobiont layers; and (3) three UV-treatments (Table 1). The number of replicates for each combination of treatment was $n = 5$. We hydrated all categories of thalli and photobiont layers and placed them on wet filter paper in open Petri dishes to keep them hydrated during the UV-exposure.

Chlorophyll fluorescence in all discs was recorded by a PAM 2000 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) before start (time = 0), and after 2, 8, 24, 48 and 96 h continuous UV-treatment at 20 °C. To reduce random photoinhibition from field exposure before start, the maximum photochemical efficiency of photosystem II (*Fv*/*Fm*) at start was measured in all thalli after keeping them hydrated for 24 h at 18 °C in low light (10–15 μmol m^{-2} s^{-1}), followed by a 15 min dark adaptation. During the experiment, *Fv*/*Fm* was measured after 15 min dark adaptation and expressed as mean percent of start values.

A generalized mixed linear model (repeated measures) was run in Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA) to test the effect of treatments on *Fv*/*Fm* as percent of start value. Original *Fv*/*Fm* data could not be used because of their skewed distribution. Thallus ID tracked through the repeated measurements was treated as a random variable, whereas UV regime (three screen types), cortex removal (exposed photobiont layer intact versus photobionts shielded by the cortex), CBSC removal (±acetone rinsing) and exposure time (2, 8, 24, 48, 96 h) were treated as fixed factors.

3. Results

Before starting the timed experiment, *Fv*/*Fm* did not differ between acetone-rinsed and control discs. However, scraped discs with exposed photobiont layer had significantly lower *Fv*/*Fm* (0.571 ± 0.012; mean ± 1 SE; $n = 30$) than intact discs (0.672 ± 0.005). This contrast was partly compensated for during the experiment: after 96 h, scraped and intact discs screened from UV reached 0.679 ± 0.006 and 0.720 ± 0.007, respectively. Thereby, the scraped, UV-B-screened discs reached higher *Fv*/*Fm* as percent of start (117 ± 2%) than their control disc counterparts (105 ± 1%; Fig. 1).

Despite our use of pale, shade-adapted *L. pulmonaria,* there were hardly any adverse effects of any of the applied UV-exposures on photobiont viability in intact control thalli (Fig. 1A), consistent with approximately no transmittance of wavelengths <325 mm (Fig. 2). In intact, but acetone-rinsed *L. pulmonaria* thalli, slight photoinhibition started after 48 h exposure of the UV-A + UV-B (>295 nm; Fig. 1B). Stronger UV-exposure (>275 nm) caused a faster and moderate, but significant reduction in *Fv*/*Fm* (Fig. 1B).

The *L. pulmonaria* photobiont was substantially more susceptible to UV radiation in thalli where the protective fungal layers had been removed. The dissected and freely exposed photobiont

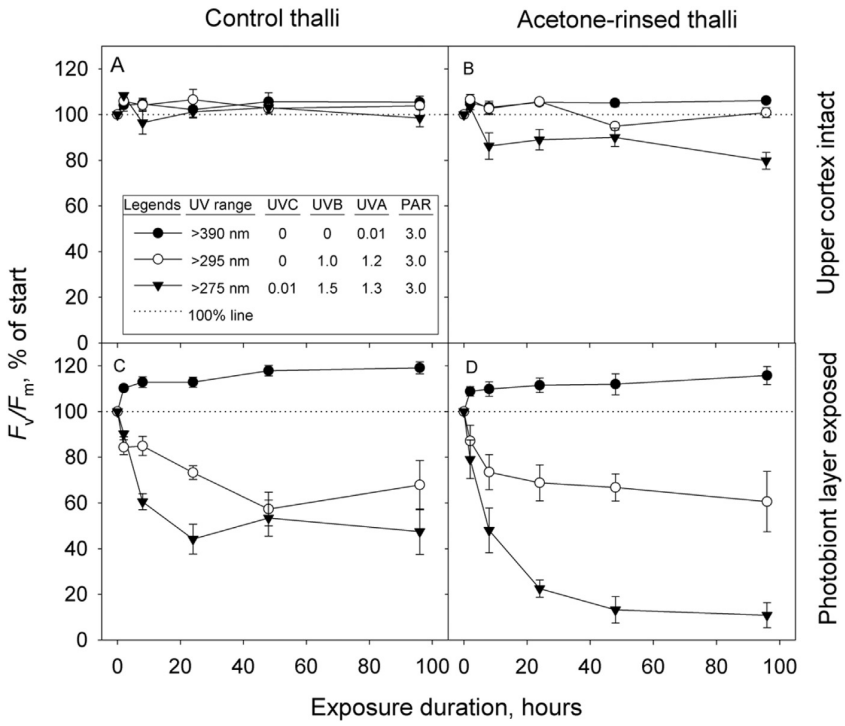


Fig. 1. The kinetics of *Fv*/*Fm* (in % of start values) in hydrated *Lobaria pulmonaria* during exposure to three different UV-B regimes (see inserted table; UV levels are given in W m^{-2}; PAR in μmol m^{-2} s^{-1}). (A) Control thalli with intact cortex. (B) Acetone-rinsed thalli with intact cortex. (C) Control thalli with directly exposed photobiont layer. (D): Acetone-rinsed thalli with directly exposed photobiont layer.

Table 1
Generalized mixed linear model (repeated measures) for *Fv*/*Fm* (given as % of start) in 60 thalli *Lobaria pulmonaria* (random factor: thallus ID), exposed to the fixed factors: (1) three UV regimes (screen); (2) with and without cortex; (3) with and without acetone rinsing; and (4) repeatedly measured after each of 5 time intervals.

Source	df	*F*	*P*
Thallus ID (Cortex Screen Acetone rinsing)	48	5.70	0.000
Time	4	37.36	0.000
Cortex	1	124.26	0.000
Screen	2	104.50	0.000
Acetone rinsing	1	11.56	0.001
Cortex*Screen	2	62.47	0.000
Screen*Time	8	22.46	0.000
Cortex*Time	4	16.62	0.000
Screen*Acetone rinsing	2	6.59	0.003
Acetone rinsing*Time	4	3.13	0.016
Cortex*Acetone rinsing	1	1.55	0.219
Cortex*Time*Screen	8	9.35	0.000
Acetone rinsing*Screen*Time	8	2.33	0.021
Cortex*Acetone rinsing*Screen	2	0.80	0.457
Cortex*Acetone rinsing*Time	2	0.35	0.841
Time*Cortex*Screen*Acetone rinsing	8	2.02	0.046
Error	192		
Total	299		

Analyzed data shown in Fig. 1. *Fv*/*Fm* was repeatedly measured after 2, 8, 24, 48 and 96 h UV-exposure. $r^2_{adj} = 0.920$.

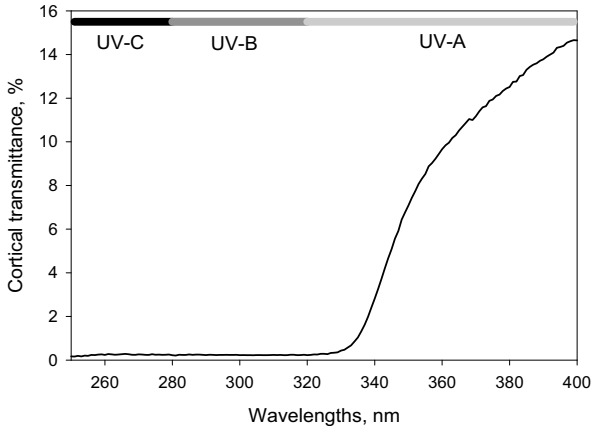


Fig. 2. UV-transmittance spectra (250–400 nm) through dry upper cortex of *Lobaria pulmonaria*. The three UV-ranges (UV-C, UV-B and UV-A) are indicated by black, dark grey, and grey horizontal lines, respectively.

layer in control thalli with natural CBSCs-contents rapidly became photoinhibited (Fig. 1C). *Fv*/*Fm* values were approximately 80% of start values already after 2 h for both UV-B regimes, and declined further to ≤50% in the most severe UV-B regime (>275 nm; Fig. 1C). For exposed photobionts in acetone-rinsed thalli, the most severe UV-B regime (>275 nm) reduced *Fv*/*Fm* to just 10% of start values (Fig. 1D), whereas the milder UV-B regime had similar effects on *Fv*/*Fm* as it had in exposed photobionts of non-rinsed controls (Fig. 1C).

Most of the UV-damage accumulated quickly (Fig. 1). The factor UV regime (screen type) had the largest overall main effect of UV on *Fv*/*Fm*, averaging 71.3 ± 3.3% across all treatments and exposure times at the hardest UV-B regime versus 108.9 ± 0.7% at the PAR treatment. The presence/absence of cortex had also a major main effect on *Fv*/*Fm*, ranking from 77.5 ± 2.8% for exposed photobiont layer to 101.2 ± 0.7% for thalli with intact cortex, whereas the main effect of acetone rinsing was minor (85.7 ± 2.5% in rinsed thalli and 93.0 ± 0.7 in intact thalli). A generalized mixed linear model

(repeated measures) for *Fv*/*Fm* showed that the main effects of UV regime, of cortex removal, as well as of exposure time were highly significant ($P < 0.001$; Table 1). Acetone rinsing causing much lower contrasts in *Fv*/*Fm*, was significant at $P = 0.001$. Among the interactions (Table 1), the cortex removal x screen-interaction was highly significant ($P < 0.001$); the adverse effect of increasing UV-exposure increased much more in thalli without than with a screening cortex. The acetone rinsing × screen interaction was also significant ($P = 0.003$), implying that the adverse effect of increasing UV-stress increased more in acetone-rinsed thalli than in control thalli (Table 1). Time highly significantly aggravated adverse effects of the strongest UV regimes as well as of the cortex removal, evidenced in the following interactions: time x screen; time x cortex, as well time * screen * cortex (Table 1) The generalized mixed linear model (repeated measures) accounted for 92% of the variation in recorded *Fv*/*Fm* (Table 1).

4. Discussion

Cortical fungal pigments have been shown to protect photobionts against excess high PAR, as reviewed by Solhaug and Gauslaa (2012). Our comparison of freely exposed versus naturally screened photobiont layers (Fig. 1B versus 1D; Table 1) emphasizes a strong, additional UV-B-protective function of the upper cortex on photobiont cells. Hardly any UV-wavelengths <325 nm transmit through the cortex of even a forest lichen deficient in melanins and cortical CBSCs (Fig. 2). A strong UV-protecting function of upper cortices have earlier been shown in extremophile lichens (Sánchez et al., 2014), allowing them to survive outer space conditions (de Vera et al., 2003; de Vera et al., 2004; Sancho et al., 2007) and to photosynthesize (de Vera, 2012; Brandt et al., 2015) and acclimate (de Vera et al., 2014) under simulated Martian conditions. We have now shown that cortical UV-screening is substantial even in the shade-adapted old forest lichen *L. pulmonaria* (Fig. 2) protecting its photobiont from all tested UV-radiation ranges (Fig. 1A).

The weak, but immediate reduction in *Fv*/*Fm* when preparing the scraped discs likely occurred because some photobiont cells were cut and damaged during scraping. The subsequent rapid recovery in scraped discs screened from UV radiation (Fig. 1C and D) was likely caused by loss of the damaged cells that contributed to lowered *Fv*/*Fm* (see e.g. Gauslaa and Solhaug 2000). Furthermore, *Fv*/*Fm* in the high-light susceptible *L. pulmonaria* often continue to relax over some weeks after transplantation from natural habitats to more shaded sites (e.g. Gauslaa et al., 2001). This is a likely reason why *Fv*/*Fm* in scraped as well as intact discs screened from UV radiation exceeded the start values and tended to increase with time.

The fact that UV-B radiation is screened already by a pale, shade-adapted upper cortex deficient in pigments (Fig. 2) also implies that the lichen cortex efficiently protects underlying fungal tissues from UV-B radiation known to cause mutations and DNA damage in fungi (e.g. Buffoni-Hall et al., 2003). Basidiomycete yeasts with a potential to influence secondary metabolism in lichens were recently reported from the cortex of many macrolichen species (Spribille et al., 2016). This means that the UV-screening partner is not necessarily the dominant ascomycete mycobiont.

Compared to the physical role in UV-B-screening by fungal tissues, the medullary stictic acid complex has a weaker role (Fig. 1; Table 1). Despite the strong UV-B absorbance of these compounds when measured in solutions (Huneck and Yoshimura, 1996), they absorb less when they occur as crystals as they do in lichens (McEvoy et al., 2007b). Nevertheless, their photoprotective effect was weak, but yet significant. Other roles have also been ascribed to such CBSCs (Lawrey, 1986). For example, the stictic acid complex in *L. pulmonaria* chelates heavy metals, although this chelation does not imply protection against these metals (Gauslaa et al., 2016). A better supported functional role is protection against parasites (Merinero et al., 2015; Asplund et al., 2016), although the best documented role is the protection against herbivory (e.g. Asplund and Gauslaa, 2008; Asplund, 2011a, b). Nevertheless, our report of some UV-screening by the stictic acid complex on lichen photobionts is consistent with the multiple role hypothesis of CBSCs (e.g. Molnár and Farkas, 2010). Yet, based on (1) evidence from the cited literature and (2) the lack of cortical UV-B transmittance (Fig. 2), we conclude that under present atmospheric conditions, the primary role of the medullary stictic acid complex is to deter herbivores rather than screen excess solar radiation. If UV-B radiation hits a thallus (Solhaug et al., 2003) and the solar radiation exposure increases (Gauslaa and Solhaug 2001), *L. pulmonaria* synthesizes melanin as sunscreen. By contrast, the stictic acid complex concentration remains unchanged (McEvoy et al., 2007a). In our shade-adapted specimens, UV-B radiation is thus screened by unknown compounds. If melanin is present, it protects against excess visible light (Solhaug and Gauslaa, 2012). This is supported by the fact that lichen melanins do not respond along strong latitudinal gradients in UV-B radiation, but along local gradients in PAR (Nybakken et al., 2004).

Acknowledgments

The research council of Norway gave the funding for the project: South Africa-Norway research cooperation (SANCOOP), project 234178, is thanked for financial support. We also thank Torfinn Torp for help with the statistical analysis.

References

Asplund, J., 2011a. Chemical races of *Lobaria pulmonaria* differ in palatability to gastropods. Lichenologist 43, 491–494.
Asplund, J., 2011b. Snails avoid the medulla of *Lobaria pulmonaria* and *L. scrobiculata* due to presence of secondary compounds. Fungal Ecol. 4, 356–358.
Asplund, J., Gauslaa, Y., 2008. Mollusc grazing limits growth and early development of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in broadleaved deciduous forests. Oecologia 155, 93–99.
Asplund, J., Gauslaa, Y., Merinero, S., 2016. The role of fungal parasites in tri-trophic interactions involving lichens and lichen-feeding snails. New Phytol. 211, 1352–1357.
Asplund, J., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2010. Optimal defense - snails avoid reproductive parts of the lichen *Lobaria scrobiculata* due to internal defense allocation. Ecology 91, 3100–3105.
Baniya, C.H., Solhøy, T., Gauslaa, Y., Palmer, M.W., 2010. The elevation gradient of lichen species richness in Nepal. Lichenologist 42, 83–96.
Bjerke, J.W., Lerfall, K., Elvebakk, A., 2002. Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divaricatic acids in two arctic-alpine lichens. Photochem. Photobiol. Sci. 1, 678–685.
Brandt, A., de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S., 2015. Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS. Int. J. Astrobiol. 14, 411–425.
Buffoni-Hall, R.S., Paulsson, M., Duncan, K., Tobin, A.K., Widell, S., Bornman, J.F., 2003. Water- and temperature-dependence of DNA damage and repair in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp *mitis* exposed to UV-B radiation. Physiol. Plant. 118, 371–379.
Cernajová, I., Svoboda, D., 2014. Lichen compounds of common epiphytic Parmeliaceae species deter gastropods both in laboratory and in Central European temperate forests. Fungal Ecol. 11, 8–16.
Chowdhury, P.P., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2016. Ultraviolet radiation reduces lichen growth rates. Symbiosis. http://dx.doi.org/10.1007/s13199-016-0468-x.
de Vera, J.-P., 2012. Lichens as survivors in space and on Mars. Fungal Ecol. 5, 472–479.
de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2003. The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space - I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. Int. J. Astrobiol. 1, 285–293.
de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2004. The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. Space Life Sci. Search Signat. Life, Space Flight Environ. Eff. Nerv. Syst. 33, 1236–1243.
de Vera, J.P., Schulze-Makuch, D., Khan, A., Lorek, A., Koncz, A., Möhlmann, D., Spohn, T., 2014. Adaptation of an Antarctic lichen to Martian niche conditions can occur within 34 days. Planet. Space Sci. 98, 182–190.

Fahselt, D., Alstrup, V., 1997. Visualization of extracellular deposits in recent and subfossil *Umbilicaria hyperborea*. Lichenologist 29, 547–557.
Gauslaa, Y., 2005. Lichen palatability depends on investments in herbivore defence. Oecologia 143, 94–105.
Gauslaa, Y., McEvoy, M., 2005. Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen Xanthoria parietina. Basic Appl. Ecol. 6, 75–82.
Gauslaa, Y., Ohlson, M., Solhaug, K.A., Bilger, W., Nybakken, L., 2001. Aspect-dependent high-irradiance damage in two transplanted foliose forest lichens, *Lobaria pulmonaria* and *Parmelia sulcata*. Can. J. For. Res. 31, 1639–1649.
Gauslaa, Y., Solhaug, K.A., 2000. High-light-intensity damage to the foliose lichen *Lobaria pulmonaria* within a natural forest: the applicability of chlorophyll fluorescence methods. Lichenologist 32, 271–289.
Gauslaa, Y., Solhaug, K.A., 2001. Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. Oecologia 126, 462–471.
Gauslaa, Y., Yemets, O.A., Asplund, J., Solhaug, K.A., 2016. Carbon based secondary compounds do not provide protection against heavy metal road pollutants in epiphytic macrolichens. Sci. Total Environ. 541, 795–801.
Huneck, S., Yoshimura, I., 1996. Identification of Lichen Substances. Springer, Berlin.
Lawrey, J.D., 1986. Biological role of lichen substances. Bryologist 89, 111–122.
McEvoy, M., Gauslaa, Y., Solhaug, K.A., 2007a. Changes in pools of depsidones and melanins, and their function, during growth and acclimation under contrasting natural light in the lichen *Lobaria pulmonaria*. New Phytol. 175, 271–282.
McEvoy, M., Nybakken, L., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2006. UV triggers the synthesis of the widely distributed secondary lichen compound usnic acid. Mycol. Prog. 5, 221–229.
McEvoy, M., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2007b. Solar radiation screening in usnic acid-containing cortices of the lichen *Nephroma arcticum*. Symbiosis 43, 143–150.
Merinero, S., Bidussi, M., Gauslaa, Y., 2015. Do lichen secondary compounds play a role in highly specific fungal parasitism? Fungal Ecol. 14, 125–129.
Molnár, K., Farkas, E., 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Z. Naturforschung Sect. C-A J. Biosci. 65, 157–173.
Nybakken, L., Solhaug, K.A., Bilger, W., Gauslaa, Y., 2004. The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. Oecologia 140, 211–216.
Pescheck, F., Lohbeck, K.T., Roleda, M.Y., Bilger, W., 2014. UVB-induced DNA and photosystem II damage in two intertidal green macroalgae: distinct survival strategies in UV-screening and non-screening Chlorophyta. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 132, 85–93.
Pöykkö, H., Hyvärinen, M., Bačkor, M., 2005. Removal of lichen secondary metabolites affects food choice and survival of lichenivorous moth larvae. Ecology 86, 2623–2632.
Rikkinen, J., 1995. What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens. Bryobrothera 4, 1–239.
Rose, F., 1976. Lichenological indicators of age and environmental continuity in woodlands. In: Brown, D.H. (Ed.), Lichenology: Progress and Problems. Academic Press, London, pp. 279–307.
Sánchez, F.J., Meessen, J., Ruiz, M.D., Sancho, L.G., Ott, S., Vilchez, C., Horneck, G., Sadowsky, A., de la Torre, R., 2014. UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. Int. J. Astrobiol. 13, 1–18.
Sancho, L.G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Rios, A., Pintado, A., Wierzchos, J., Schuster, M., 2007. Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. Astrobiology 7, 443–454.
Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 1996. Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen Xanthoria parietina. Oecologia 108, 412–418.
Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2001. Acetone rinsing - a method for testing ecological and physiological roles of secondary compounds in living lichens. Symbiosis 30, 301–315.
Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2004. Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. Plant Cell Environ. 27, 167–176.
Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2012. Secondary lichen compounds as protection against excess solar radiation and herbivores. Prog. Bot. 73, 283–304.
Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., Nybakken, L., Bilger, W., 2003. UV-induction of sun-screening pigments in lichens. New Phytol. 158, 91–100.
Solhaug, K.A., Larsson, P., Gauslaa, Y., 2010. Light screening in lichen cortices can be quantified by chlorophyll fluorescence techniques for both reflecting and absorbing pigments. Planta 231, 1003–1011.
Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M.C., Schneider, K., Stabentheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., Mayrhofer, H., Johannesson, H., McCutcheon, J.P., 2016. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. Science 353, 488–492.

Résumé / Abstract

Actuellement, plus de 70% des biomédicaments commercialisés sont des glycoprotéines recombinantes. Les coûts élevés de production de ces biomédicaments ont poussé les scientifiques à développer des organismes de production alternatifs. Récemment, les microalgues ont été proposées en tant que potentiel système de production compte-tenu de leur rapidité de croissance et de leurs faibles coûts de production. Cependant, avant de produire des biomédicaments industriels chez les microalgues, il est impératif de s'assurer que les modifications post-traductionnelles, comme la *N*-glycosylation, soit conservées et compatibles avec une utilisation thérapeutique. Dans ce contexte, l'étude de la *N*-glycosylation de deux microalgues modèles, *Chlamydomonas reinhardtii* (microalgue verte) et *Phaeodactylum tricornutum* (diatomée) a été réalisée. Dans un premier temps, l'ingénierie de la *N*-glycosylation de *C. reinhardtii* a été initiée en exprimant une *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I) hétérologue. Les résultats obtenus ont permis de réévaluer les voies de *N*-glycosylation de *C. reinhardtii* et de montrer que cette microalgue synthétise une structure glycannique linéaire qui n'est pas substrat de la GnT I. Dans un second temps, un protocole d'extraction et de caractérisation des précurseurs glycanniques de *C. reinhardtii* et *P. tricornutum* a été développé et appliqué pour déterminer la structure des précurseurs glycanniques dans ces espèces. Enfin, la caractérisation de deux xylosyltransférases potentielles (XTA et XTB) de *C. reinhardtii* a été menée en utilisant des mutants d'insertion et des analyses des *N*-glycannes par spectrométrie de masse. Cette étude a confirmé les rôles spécifiques de XTA et XTB dans la voie de *N*-glycosylation de *C. reinhardtii*.

Mots clés : ***Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *N*-glycannes, *N*-acétylglucosaminyltransférase I, LLO, mutants, xylosyltransférases.**

Currently, more than 70% of the commercialized biopharmaceuticals are glycoproteins. The high production costs lead scientists to develop alternative organisms suitable for such production. Recently, microalgae emerged as a potential interesting production system thanks to their quick growth rate and low production costs. However, prior to start industrial glycoproteins production in microalgae, protein post-translational modifications like *N*-glycosylation, must be carefully controlled. This PhD thesis focused on the analysis of the *N*-glycosylation pathway of two different microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii* (green microalgae) and *Phaeodactylum tricornutum* (diatom). In order to start *N*-glycan engineering, heterologous *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnT I) sequences were expressed in *C. reinhardtii*. This study demonstrated that *C. reinhardtii* synthetize a linear *N*-glycan unsuitable for GnT I activity and allows the reinvestigation of the *C. reinhardtii N*-glycosylation pathway. A second chapter of this work focus on the optimization of a protocol suitable for analyzing the structure of the Dolichol *N*-linked precursors of *C. reinhardtii* and *P. tricornutum.* Lastly, two potential xylosyltransferases (XTA and XTB) from *C. reinhardtii* were characterized using insertional mutants and *N*-glycomic analyses by mass spectrometry approaches. This work allows us to propose specific involvement of XTA and XTB in the xylosylation processing of *C. reinhardtii N*-glycans.

Keywords: ***Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *N*-glycans, *N*-acetylglucosaminyltransferase I, LLO, mutants, xylosyltransferases**